

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Werner

**Polymorphismen in den Somatostatinrezeptoren SSTR₁ und SSTR₂ bei
hepatozellulären Karzinomen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Fariz Abdullayev

aus
Barda
Aserbajdschan

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Siebeck
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Christian Steib
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Helga-Paula Török
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	07.04.2016

*In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern, Vater Alishir und Mutter
Mahbuba, die mir diesen Weg ermöglichten und meiner Tochter
Leyla, die mich immer motiviert hat.*

In Erinnerung an meine Omi.

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-1-Fetoprotein
ATL-Puffer	Animal tissue lysis buffer
BMI	Body mass index
BMI-1	B-lymphoma moloney murine leukemia virus insertion-1
bp	Basenpaar
CA	Dinukleotid
CNVs	Copy number variation
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphaten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FHIT	Fragile histidine triad protein
FLA	Fragment-Längen-Analyse
GH	Growth Hormone
GWAS	Genome-wide association studie
HBV	Hepatitis B
HCV	Hepatitis C
HiDi	Deionisierte Formamide
i.m.	Intramuskulär injektion
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
KUM	Klinikum der Universität München
MAP	Mitogen activated Protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMR	Mismatch repair
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTT	Molecular targeted therapy
N	Anzahl der untersuchten Population
OCT	Oktreotid

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Perkutane Alkohol-Injektion
PET	Pazitron Emission Tomografie
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonukleinsäure
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
SNP	Einzelnukeotidpolymorphismen
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
T°C	Temperatur in Celsius
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TRIS (Puffer)	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide
WWOX	WW domain containing oxidoreductase

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	8
1.1.1. Epidemiologie des HCCs.....	8
1.1.2. Krankheitsbild und Diagnostik des HCC.....	8
1.1.3. Ätiologie des HCC.....	10
1.1.3.1. Die Hepatitis B und C sowie andere Umweltfaktoren in der Pathogenese des HCC.....	10
1.1.3.2. Die Rolle genetischer Faktoren	12
1.1.4. Die Therapieoptionen beim HCC.....	16
1.1.4.1. Die chirurgische Therapie des HCCs	16
1.1.4.2. Loko-regionale Therapiemethoden.....	17
1.1.4.3. Die Chemotherapie oder <i>molekular target therapie</i> (MTT).....	19
1.1.4.4. Weitere Therapieansätze.....	20
1.2. Somatostatin und seine Rezeptoren.....	21
1.2.1 Somatostatin.....	21
1.2.1.1. Die Rolle von Somatostatin im Zellzyklus und in der Apoptose	22
1.2.1.2. Das Somatostatinanaloga Oktreotid und seine Wirkung in Zelllinien und in Tiermodellen.....	23
1.2.1.3. Oktreotid in der Therapie bei Patienten mit HCC.....	24
1.2.2. Somatostatinrezeptoren.....	25
1.2.2.1. Expression von Somatostatinrezeptoren beim HCC.....	27
1.2.2.2. Polymorphismen in den Genen für die Somatostatinrezeptoren.....	28
1.3. Zielsetzung der Arbeit.....	29
2. Material.....	30
2.1. Studienpopulation.....	30
2.1.1. Patientenkollektiv	30
2.1.2. Kontrollkollektiv.....	30
2.2. Kits und Chemikalien.....	30
2.2.1. Materialien für die DNA-Isolierung.....	30
2.2.2. Materialien für die Polymerasekettenreaktion (PCR) und für die Reinigung der PCR-Produkte.....	31
2.2.3. Oligonukleotide.....	31

2.3. Geräte.....	32
3. Methoden.....	33
3.1. Allgemeine Vorgehensweise.....	33
3.2. Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Blutproben.....	33
3.2.2. Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben.....	34
3.2.3. Die Polymerasekettenreaktion.....	34
3.2.4. Agarosegelelektrophorese.....	37
3.2.5. Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung.....	38
3.2.6. Fragmentlaengeranalyse für die Typisierung der SSTR <i>tandem-repeat</i> Polymorphismen.....	39
3.3. Statistische Auswertung.....	39
4. Ergebnisse.....	41
4.1. Die Goldstandards für die Mikrosatellitenanalyse.....	41
4.2. Mikrosatelliteninstabilität beim HCC.....	42
4.3. Verteilung des <i>CA-dinucleotid-tandem repeat</i> Polymorphismus im Intron 1 des SSTR ₂ -Gens bei Kontrollpersonen und Patienten mit HCC.....	43
4.4. Verteilung des <i>CA-dinucleotid-tandem repeat</i> Polymorphismus im SSTR ₁ bei Patienten mit HCC und bei Kontrollpersonen.....	46
5. Diskussion.....	50
5.1. Studiendesign und Methoden.....	50
5.1.1. Studiendesign - genetische Assoziationsstudie.....	50
5.1.2. Studienmaterial: Ausschluß einer Mikrosatelliteninstabilität.....	50
5.1.3. Validität der Genotypisierungsmethoden.....	51
5.2. Verteilung der Polymorphismen in der Studienpopulation.....	52
5.2.1. Verteilung der Polymorphismen in der Kontrollpopulation im Vergleich zu Daten aus der Literatur.....	52
5.2.2. Die SSTR ₁ - und SSTR ₂ - Mikrosatellitenpolymorphismen beim HCC.....	54
5.3. Bewertung der Ergebnissen aus funktioneller Sicht.....	55
5.4. Ausblick.....	56
6. Zusammenfassung.....	58
7. Literaturverzeichnis.....	59
8. Danksagung.....	75
9. Eidesstattliche Versicherung.....	77

1. Einleitung

1.1. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)

1.1.1. Epidemiologie des HCCs

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der häufigsten malignen Tumoren weltweit. Die globale Inzidenz liegt bei einer Million Neuerkrankungen pro Jahr. Es ist das fünfthäufigste Karzinom weltweit und die dritthäufigste Ursache von krebsbedingten Sterbefällen, mit fast einer halben Million Todesfällen jährlich (1,2,3,4). In Südostasien und Afrika ist das HCC mit einer Inzidenz von bis zu 30 Fällen pro 100 000 Einwohnern das häufigste Malignom. In Europa und den USA liegt mit 5 bis 13 Fällen pro 100 000 Einwohnern und pro Jahr eine niedrigere Inzidenz vor, die jedoch dramatisch zunimmt (5), besonders in den USA wegen der Ausbreitung des Hepatitis C-Virus (1,6). Die Inzidenz unterscheidet sich abhängig vom Geschlecht und ethnisch-geografischer Herkunft. Während in westlichen Nationen 90% des HCCs aufgrund einer Leberzirrhose entstehen, lässt sich dieses klare Verhältnis in Asien und Afrika nicht nachvollziehen, was an eine unterschiedliche Pathogenese denken lässt (7). Ungefähr 4 Millionen Menschen in den USA sind chronische Träger eines Hepatitis C-Virus, von diesen entwickeln ca. 10 % eine Leberzirrhose und etwa 5% von diesen zirrroskranken Patienten entwickeln ein HCC (8). Die Erkrankung kommt bei Männern viermal häufiger vor als bei Frauen. Bei Männern beträgt die Letalität in Ländern mit einer niedrigen Inzidenz, wie den USA, 1,9 pro 100 000 Einwohner pro Jahr; in Ländern mit einer mittleren Inzidenz, wie Österreich und Australien, liegt die Letalität zwischen 5,1 und 20,0 pro 100 000 Einwohnern pro Jahr. In asiatischen Ländern mit hohen Inzidenzen, wie China und Korea, liegen die Sterberaten sogar zwischen 23 und 150 auf 100 000 jährlich (8). Bei HCCs handelt es sich überwiegend um Adenokarzinome. Daneben kommt in circa 20 Prozent der Fälle auch ein fibrolamelläres HCC (FL-HCC) vor. Insgesamt ist die Überlebensdauer unbehandelter Patienten gering.

1.1.2. Krankheitsbild und Diagnostik des HCC

Typische Beschwerden bei Patienten mit einem HCC sind abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust, Schwächegefühl, Völlegefühl sowie Ikterus und Übelkeit. Durch Aszites kann bei der zugrunde liegenden Zirrhose oder auch durch einen schnell wachsenden Tumor der Bauchumfang zunehmen. Ein Ikterus wird als Spätsymptom eingeschätzt

werden, weil er ein Zeichen einer Obstruktion der intrahepatischen Gallenwege sein kann. Durch Ösophagusvarizen kann es bei einer portalen Hypertension zu einer vital bedrohlichen Blutung kommen. Eine solche Blutung oder eine akute intraperitoneale Blutung können zum Tod führen. Knochenschmerzen kommen bei bis 12 Prozent der Patienten vor, ein Knochenbefall bestätigt sich bei Untersuchungen sogar bei ungefähr 20 Prozent der Patienten. Viele Patienten sind jedoch sogar mit fortgeschrittener Erkrankung asymptomatisch. Der häufigste körperliche Untersuchungsbefund ist eine Hepatomegalie, diese findet sich bei rund 50 Prozent aller Patienten. Ein Aszites kommt bei 30 bis 60 Prozent der Patienten vor. Eine Splenomegalie findet sich bei einer portalen Hypertension. Gewichtsverlust und Muskelabbau sind häufige Symptome, insbesondere bei sich rasch wachsenden oder großen Tumoren. Bei einigen der Patienten kann auch Fieber vorkommen. Als typische Leberzeichen können Ikterus, erweiterte Bauchhautvenen, Palmarerythem, Gynäkomastie, Hodenatrophie und periphere Ödeme auftreten. Bei einer Infiltration der Lebervenen durch den Tumor kann sich ein Budd-Chiari-Syndrom entwickeln, welches auch die HCC-Progression beschleunigt (9).

Bei der **HCC-Diagnostik** sind anamnestische Angaben zum Allgemeinzustand, psychosoziale Faktoren sowie zu prädisponierenden Faktoren wie Hepatitis, Bluttransfusionen, Einnahme von Kontrazeptiva, Drogenmissbrauch, HCC in der Familie und die Berufsanamnese wegen Kanzerogenen sehr wichtig. Heutzutage spielen apparative Untersuchungsmethoden eine wichtige Rolle bei der Diagnostik und Differentialdiagnostik des HCCs (8). Die einfachste, fast komplikationslose, schmerz- und belastungsfreie, nicht-invasive, aber auch genaue Methode bleibt immer noch die Ultraschalluntersuchung. Sie stellt eine ausgezeichnete Screeningmethode dar. Die Genauigkeit der Kontrastmittel-Sonografie ist mit der der Spiral-CT oder der MRT zu vergleichen (10). Typische Merkmale sind die Hypervaskulasierung und das schnelle venöse „washout“. Bei Vorhandensein dieser Kontrastmitteldynamik und zusätzlichen Zirrhosezeichen kann die Diagnose eines HCC nach radiologischen Kriterien gestellt werden. Nuklearmedizinischen Untersuchungen (*PET*, *⁶⁷Gallium-SPECT*) wird aufgrund der geringen Sensitivität nur ein begrenzter Stellenwert eingeräumt (11,12). Unter den serologischen Markern ist das alpha-Fetoprotein (AFP) ein Standard-Marker im Screening und ein guter Prediktor für den Verlauf des HCCs nach Therapie (13,14,15). Die Sensitivität beträgt 40-65%, die Spezifität liegt bei 76–96%, abhängig von den „cut-

off“ Werten. Der zweite, seltener eingesetzte Tumormarker ist das Des-Gamma-Carboxyprothrombin (DCP), ein Protein, das bei Vitamin-K-Mangel gebildet wird. Dieses Protein ist bei bis zu 80 Prozent der HCC-Patienten erhöht (8). Zahlreiche vielversprechende neue Marker werden weiterhin evaluiert, bis dato hat sich jedoch keiner im klinischen Alltag durchgesetzt (16,17,18). Bei unklarem bzw. nicht typischem radiologischem Befund oder fehlenden Zirrhosezeichen soll zur Diagnosebestimmung und auch zur Differenzierung zwischen einem primären HCC oder einem metastatischen Adenokarzinom eine histopathologische Untersuchung erfolgen. Eine Kombination von verschiedenen Methoden, sowohl radiologischen als auch molekular- und histopathologischen, steigert die Genauigkeit und Sensitivität der Diagnostik (19,20). Jedoch treten nicht selten primäre HCC multizentrisch auf und die Symptome sind meist ein Spätzeichen. Häufig werden HCC bei einer aus einem anderen Grund durchgeführten Untersuchung der Leber zufällig entdeckt.

1.1.3. Ätiologie des HCC

Der wesentliche ätiologische Faktor für die Entstehung eines HCC ist die Leberzirrhose. In fast 70 % der Fälle ist eine Leberzirrhose als Grunderkrankung zu finden (1,2,6,21). Die Leberzirrhose selbst entsteht durch Erkrankungen wie Alkoholismus, chronische Virushepatitis, Autoimmunhepatitis, nicht alkoholische Steatohepatitis, primär sklerosierende Cholangitis, Autoimmunchoangiopathie sowie erblich bedingte Stoffwechselerkrankungen wie Hämochromatose, Wilson-Krankheit, Antitrypsin-Mangel, zystische Fibrose oder Mukoviszidose (8). Die virale Hepatitis B und C sowie die Leberzirrhose anderer Ätiologie gehen mit einem 35- bis 120-fach erhöhten Erkrankungsrisiko einher (22).

1.1.3.1. Die Hepatitis B und C sowie andere Umweltfaktoren in der Pathogenese des HCC

Die wesentlichen Umweltfaktoren, die in der Pathogenese des HCC eine Rolle spielen, sind virale Infektionen mit Hepatitis B (HBV) oder C (HCV)-Viren, die Intoxikation mit Aflatoxin oder der Alkoholabusus. Weltweit sind etwa 170 Mio. Menschen mit dem Hepatitis C-Virus infiziert, von denen ca. 80 % eine chronische Hepatitis C entwickeln und mehr als 400 Mio. Menschen mit dem Hepatitis-B-Virus, von denen ca. 5 % eine chronische Hepatitis B entwickeln. In Europa sind ungefähr 3 bis 5 Mio. Menschen

erkrankt, davon ca. 8-10 % in Deutschland. In Südostasien und Südafrika, wo Hepatitis B endemisch vorkommt, sind fast 15% der Bevölkerung damit infiziert und diese Daten spiegeln sich auch in der Häufigkeit des HCC wieder (8). HBV ist ein onkogenes Virus der Familie der Hepadna-Viren, das sich in das Genom der infizierten Wirtszelle integrieren kann und damit einen selektiven Wachstumsvorteil verursacht (23). Die Integration verläuft häufig in Genen, die in der Wachstumskontrolle involviert sind und kann so die chromosomale Instabilität der Wirtszelle durch invertierte Duplikationen, Deletionen, und chromosomale Amplifikationen fördern. Zusätzlich kodiert das HBV Virus-Genom für die regulatorische Proteine HBX und PreS2, die beide tumor-fördernde Funktionen haben können und zu einer positiven Selektion in der Zellvermehrung führen (24). Im Gegensatz zu HBV kann sich das HCV RNA Virus durch das Fehlen einer reversen-Transkriptaseaktivität nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren (25). Daher wird das HCV-induzierte HCC indirekt durch Mechanismen der chronischen Entzündung, Fibrose und Zirrhose verursacht, wodurch das HCV-bedingte HCC beinahe ausschließlich von Zirrhose begleitet ist. Jedoch können HCV-infizierte Patienten, die keine Zirrhose aufweisen, durch das transformierende Potenzial der viralen Proteine HCV core, NS3, NS4B und NS5A eine Hepatokanzerogenese durchlaufen (26). Während die Interaktion mit Hepatitis B und Aflatoxin die vorwiegenden Gründe für das Auftreten des HCC in Asien und Afrika sind, stellen Hepatitis C und Alkoholmissbrauch die häufigsten Ursachen für das HCC in der westlichen Hemisphäre dar.

Unabhängig von der kanzerogenen Induktion liegt eine chronische Hepatitis, eine Fibrose oder Zirrhose bei rund achtzig Prozent der HCC Patienten vor (27). Daher nehmen ätiologische Faktoren wie die nicht-alkoholische Steatohepatitis, die in einem geringeren Ausmaß zur Entstehung der Fibrose und Zirrhose führen, ebenso eine potentielle Rolle in der Entwicklung des HCC ein (28). Die zirrhotischen Läsionen, die im Allgemeinen den dysplastischen HCC-ähnlichen Foci vorangehen, zeigen bereits genetische Veränderungen, die während der Hepatokanzerogenese akkumulieren (29).

Ein HCC kann auch ohne zugrundeliegende Zirrhose entstehen. Das fibrolamelläre Karzinom, welches etwa 1 % aller HCC ausmacht, kommt in gesunder, nicht zirrhotischer Leber und insbesondere bei jungen Patienten vor (30,31). HCC ohne begleitende Zirrhose sind mit einem besseren *Outcome* assoziiert und werden daher großzügig einer chirurgischen Therapie zugeführt (32).

Der Alkoholkonsum erschwert das Krankheitsbild bei allen o.g. Krankheiten und führt sowohl zur Steigerung des Risikos der Leberzelltransformation als auch des Therapieversagens und der Mortalität.

1.1.3.2. Die Rolle genetischer Faktoren

Wie bei anderen Krebsarten, spielen genetische Alterationen in der Entstehung des HCC eindeutig eine wichtige Rolle. Unabhängig davon, ob das HCC auf dem Boden einer chronischen Hepatitis, Leberzirrhose, Autoimmunkrankheiten, sklerosierenden Cholangitis, erblich bedingter Stoffwechselerkrankungen, Hämochromatose oder Mukoviszidose entsteht, ist die Alteration fragiler Genregionen, welche zu Genpolymorphismen und dann zur Änderung der Zelldifferenzierung führt, ein Schlüsselprozess in der Karzinogenese. Die Untersuchung dieser Prozesse könnte in der Zukunft die Möglichkeit einer gezielten Behandlung dieser Veränderungen, Mutationen und Expressionsmuster in der Therapie des HCC geben.

Somatische Genmutationen

Sowohl in Tiermodellen als auch im menschlichen Material wurde nach somatischen Mutationen beim HCC gesucht. Ende 2007 wurde das Tumorsuppressor-Gen ***Fragile histidine triad protein (FHIT)*** beschrieben, das bei ca. 60% der HCC-Patienten mutiert ist. Das Gen soll extrem anfällig für Kanzerogene wie Aflatoxin, Benzo(a)pyrene, Nikotin und andere Substanzen sein (33,34). Durch die Korrektur des mutierten Bereiches dieses Gens in Krebszellen konnte die Produktion etlicher Proteine wiederhergestellt werden, die Expression von Tumorsuppressoren induziert und das unkontrollierte Tumorzellenwachstum in Zellkultur verringert werden (35).

Auch das ***WWOX (WW domain containing oxidoreductase)-Gen*** hat fragile Domänen, (*FRA16D*), die sehr oft in Tumorzellen alteriert gefunden worden sind. Mehrere Studien konnten zeigen, dass *WWOX* ein Tumorsuppressor ist, welcher sehr effektiv und unabhängig von der Pathogenese das Tumorstadium verhindert (36). Das Fehlen oder die reduzierte Expression von *FHIT* und *WWOX* sind mit einer schlechteren HCC-Prognose assoziiert (37).

Weiterhin wurden Alterationen in den Genen für *enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)* und *B-lymphoma moloney murine leukemia virus insertion-1 (BMI-1)* beim HCC und

anderen Krebsarten beschrieben. Diese Proteine, die zu dem *polycomb group gene (PcG)* gehören (38,39), spielen bei der Invasivität, Metastasierung, Aggressivität, Differenzierung und Prognose des Tumors eine Rolle (40,41,42,43,44,45,46).

Die bekannten Kandidaten **p53** und **p33** spielen in Zellwachstum, Zellalterung und Apoptosesregulation eine Rolle (47,48,49,50). Die beiden Hepatitisviren, HCV und HBV stören durch die Integration in die Wirtszelle die p53-Genfunktion, verringern seine Expression und verhindern wesentlich seine Funktion, was zur Entstehung eines HCCs führt (51,52). Einige Studien konnten zeigen, dass die Überexpression des mutierten p53-Proteins auch mit erhöhten *AFP*-Werten korreliert (53,54).

Ein wichtiger Beweis für die Rolle von *p53* in die HCC-Entstehung bringt die Arbeit von Chen et al. in der bei HCC-Patienten die *p53*-Gensequenzen in die A. hepatica mittels eines Implantates eingeführt wurden und damit eine *p53*-Überexpression erzeugt wurde. Dadurch ist es den Autoren gelungen, nach 3, 6, 9 und 12 Monaten signifikante Überlebensvorteile bei 30 Patienten mit HCC im Vergleich zu 18 Kontrollpatienten zu erzeugen (55). Yu et al. konnten mit der gleichen Methode bei mit *p53* behandelten HCC-Patienten mit Lungen-Metastasen eine signifikante Rückbildung der Metastasen beobachten (56).

Auch eine Überexpression von Stathmin und Osteopontin korreliert mit den *p53*-Mutationen und ist mit Tumorprogression und einer schlechten Verlaufsprognose assoziiert. Die Stathmin- und Osteopontin-Überexpression können als Tumormarker in der HCC-Diagnostik und als Prediktor für die Operabilität dienen (57,58).

Genomische Veränderungen - "*germ line*"

Polymorphismen im AFP-Gen

Alpha-1-Fetoprotein (AFP) ist ein 70kDa onkofetales Glykoprotein mit 591 Aminosäuren und ein empfindlicher Marker in der Diagnostik und im Monitoring der Therapie beim HCC. Laut klinisch-pathologischen Untersuchungen ist eine erhöhte *AFP*-Expression immer mit mutierter *p53* Überexpression im HCC-Gewebe assoziiert (53,54). Das *AFP*-Gen ist auf dem Chromosom 4 (4q11 – q13) lokalisiert. Die biologische Funktion ist bis heute nicht vollständig bekannt. Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Albumin (das Gen gehört zur *Albuminoid Gen* Superfamilie) werden ihm vor allem Transportsaufgaben

zugeschrieben. Ein Einfluss auf die Zellregulation sowie eine immunsuppressive Wirkung sind ebenfalls beschrieben worden.

Suriapranata et al. haben DNA von 119 Patienten mit HCC, 119 Patienten mit Zirrhose ohne HCC und 109 Kontrollpersonen isoliert und nach *tandem repeat* Polymorphismen in *AFP*-Gen gesucht. Acht von den 47 gefundenen *SNPs* assoziierten sich signifikant mit dem HCC, der Zirrhose und dem Zirrhoserisiko (13). Auch Chen et al. haben bei 83 HCC-Patienten nach *tandem-repeat* Polymorphismen im *AFP*-Gen gesucht. Sie haben 3 neue *SNPs* in der Promoterregion des *AFP*-Gens gefunden. Interessanterweise korrelierte die *AFP*-Expression im Serum bei den HCC-Patienten mit diesen (*CT*-, *AG*- und *GC*) *tandem-repeat* Polymorphismen, was für eine funktionelle Relevanz spricht (14).

Polymorphismen in den p450 (CYP)-Genen

Es gibt mehrere Studien die *p450* (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2E1* und *CYP3A4*)-Genpolymorphismen beim HCC untersucht haben (59,60,61,62,63).

Li et al. haben in einer chinesischen Population 1006 HCC-Patienten und 1015 Kontrollpersonen ohne HCC nach vier ausgewählten *SNPs* im Cytochrome *P450 1A1* untersucht. Verschiedene genetische Varianten im *P450 1A1* schienen hier die Entstehungs- und Entwicklungsrisikos eines HCCs zu erhöhen (62). Es gibt auch Untersuchungen, die zeigen, dass *CYP1A1*-Genpolymorphismen mit der HCC-Entstehung assoziiert sind und dass dieses Risiko bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern stark erhöht ist (61,62). Silvestri et al. beobachteten, dass bei HCV-infizierten Patienten, bei denen auch *CYPs*-Genpolymorphismen bestehen, das Entstehungsrisiko eines HCC höher liegt (63).

Polymorphismen bei HBV und HCV-infizierten Individuen

Bei der Suche nach Polymorphismen in HCC-Patienten sind solche auch bei HCV-infizierten Personen untersucht worden. Beispielsweise konnten Wang et al. bei HCV-infizierten Patienten *Interleukin-1beta*-Genpolymorphismen nachweisen, welche eine Assoziation mit der HCC-Anwesenheit zeigten (64). Weitere Studien zeigten eine Assoziation zwischen *UDP-glucuronosyltransferase 1A7* und *IL-β* Genpolymorphismen und HCC bei HCV-infizierten Patienten (65,66,67,68).

Diese Einzelbeobachtungen sind bisweilen wenig relevant und bedürfen in der Regel einer Bestätigung durch Replikationsstudien. Wichtige Informationen kommen aus **Metaanalysen**, welche die Befunde einzelner Studien summieren. Zwei interessante Metaanalysen wurden bezüglich des HCC veröffentlicht (69,70). In der ersten Analyse haben die Autoren nur die *SNPs*, die bis 2010 in mehr als drei Studien auf einer Assoziation mit dem HCC hin untersucht wurden, ausgewählt. Hier waren 6 *SNPs* in 5 Genen (*HFE*, *UGT1A7*, *MDM2*, *IL-1B*, *MnSOD*) mit dem HCC statistisch signifikant assoziiert. Zwei der *SNPs* (*rs1800562* im *HFE*-Gen und *rs2279744* im *MDM2*-Gen) waren grenzwertig signifikant und sollen noch in unabhängigen Studien untersucht werden (69). Die Metaanalyse von Wang et al., in der alle bis 2009 veröffentlichten Studienergebnisse (zusammen 3349 HCC-Fälle und 5609 Kontrollen) für eine Assoziation von HCC mit glutathione S-transferase Gen Polymorphismen (*GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen) analysiert worden sind, zeigte, dass *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen bei Asiaten mit einem erhöhten HCC-Risiko assoziiert sind. Individuen, bei denen beide Gene, *GSTM1* und *GSTT1* homozygot mutiert sind, haben ein stark erhöhtes Risiko für die Entstehung eines HCC (70).

Eine zweite wichtige Information kommt aus **genomweiten Assoziationsstudien**. Ende 2010 wurde die erste *GWAS* (*genome-wide association studie*) für das HCC veröffentlicht (71). Hier wurde DNA von 386 koreanischen HCC-Patienten, 86 koreanischen Leberzirrhose-Patienten, 587 gesunden Kontrollen koreanischer Abstammung sowie 100 chinesischen gesunden Kontrollen auf *CNVs* (*copy number variation*) und *SNPs* untersucht. Dabei zeigten 9 *SNPs* eine signifikante Assoziation mit dem HCC. Drei von den 9 genomischen Variationen (*rs9267673*, *rs2647073* und *rs3997872*), die die stärkste Signifikanz bezüglich einer Assoziation mit dem HCC zeigten, liegen im MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Klasse II Locus. Hiermit konnten die Wissenschaftler beweisen, dass Polymorphismen in dem MHC Klasse II Locus, welche die Generation und Proliferation von T-Zellen beeinflussen, eine Rolle bei der Entstehung des HCCs spielen. Weiterhin wurden in der Studie 2 *SNPs* identifiziert, deren Allel-Frequenzen sich signifikant zwischen HCC und der Leberzirrhose unterscheiden. Der erste Polymorphismus liegt auf dem Chromosom 2 in der Region 2q14.1, ca. 175 kb weit von dem nächsten Gen (d.h. in einem „*gene desert*“) entfernt. Die zweite Variation liegt innerhalb des Introns des *TPTE2*-Gens, welches für das *PTEN*-Homolog, *tumor suppressor*

protein kodiert. Die Assoziation spricht für eine Rolle von *TPTE2* in der Karzinogenese und bei der Entwicklung des HCCs aus einer Zirrhose (71).

1.1.4. Die Therapieoptionen beim HCC

Abhängig vom Tumorstadium, der Klinik und dem Zustand des Patienten entscheidet man beim HCC zwischen chirurgischen und nicht chirurgischen Therapieoptionen. In den letzten Jahren hat sich die Behandlung des HCCs signifikant gewandelt. Hierzu hat auch die Tatsache beigetragen, dass die Einführung von sonografischen Screeningprogrammen für Patienten mit Leberzirrhose zunehmend zur Diagnose eines HCC im Frühstadium führt, was den Einsatz kurativer Therapieoptionen ermöglicht.

1.1.4.1. Die chirurgische Therapie des HCC

Die Leberresektion und die Lebertransplantation stellen potenziell kurative Behandlungsoptionen dar. Sie können jedoch nur bei einer limitierten Anzahl von Patienten angewandt werden. Die Indikation zur Leberresektion besteht bei Patienten mit kleinem HCC ohne Zirrhose. In Ausnahmefällen kann auch eine Resektion eines HCC in einer zirrhotischen Leber erfolgen (Child A), wenn die Möglichkeit zur Lebertransplantation nicht gegeben ist. Für Rezidive nach Resektion ist eine erneute Operation selten sinnvoll (72), eventuell bieten sich hier nicht chirurgische Maßnahmen an (73).

Vom onkologischen und hepatologischen Gesichtspunkt stellt die Lebertransplantation die optimale Therapie für das HCC dar, da neben dem Tumor auch die zugrunde liegende Leberzirrhose als Präkanzerose beseitigt wird. Die Lebertransplantation ist Methode der Wahl bei Patienten mit Zirrhose und einer Tumorgröße innerhalb der *Milan*-Kriterien. Zurzeit besteht nach *Milan*-Kriterien eine klare Indikation zur Lebertransplantation bei Patienten mit Leberzirrhose und solitärem HCC kleiner als 5 cm oder bei maximal 3 HCC-Herden bis 3 cm Durchmesser des größten Herdes. Der Mangel an Spenderorganen sowie die daraus resultierende Zeit auf der Warteliste sind prognoselimitierende Faktoren. Daher führt man eine so genannte „*bridging Therapie*“ durch, um die Zeit, bis eine Spende-Leber zur Verfügung steht zu überbrücken. Als „*bridging Therapie*“ bis zur Transplantation werden alle interventionelle Techniken und auch systemische Therapien eingesetzt (74). Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die

Radiofrequenzablation (RFA) werden auch zunehmend intraoperativ in Ergänzung zur Leberresektion eingesetzt. Das Langzeitüberleben wird nach Operationen signifikant durch das Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen eingeschränkt. Die Anwendung des Multikinase-Inhibitors Sorafenib in der *(neo-)adjuvanten* Situation wird gegenwärtig in prospektiven Studien untersucht.

1.1.4.2. Loko-regionale Therapiemethoden

Als konservative interventionelle Therapie bei den Patienten, bei denen eine radikale Operation keinen Vorteil mehr bringt oder eine Lebertransplantation nicht mehr möglich ist, kommen Behandlungsmethoden wie die RFA, TACE und SIRT (selektive interne Radiotherapie) in Frage (75).

Die perkutane Tumorablation umfasst mehrere potentielle Therapiekonzepte. Eine große Gruppe der ablativen Methoden stellen die thermisch induzierten Ablationstechnologien dar, wobei die Radiofrequenzablation neben der Mikrowellenablation und der laserinduzierten Ablation das wohl bekannteste hyperthermische Verfahren darstellt. Hyperthermische Verfahren zeichnen sich dadurch aus, dass das Zielgewebe auf über 42°C erhitzt und dadurch die Zellhomöostase beeinflusst wird. Eine nahezu vollständige Koagulation des Zielgewebes ist induziert, wenn Temperaturen zwischen 60°C und 100°C erzielt werden. Diese manifestiert sich in einem irreversiblen Schaden der Mitochondrien und der flüssigen Bestandteile des Zytoplasmas der Tumorzellen und deren DNA (76). RFA ist die bekannteste nicht chirurgische Technik für die HCC-Therapie in frühem Stadium bei nicht resezierbarem HCC. Wichtigste Vorteile der RFA sind die geringe Invasivität, die lokale Möglichkeit der Tumorkontrolle und vielversprechende Langzeitergebnisse (77).

Die perkutane Alkohol-Injektion (PEI) ist von den neuen effektiveren lokal wirkenden thermalen Ablationstechniken abgelöst worden und wird heute selten angewendet (78). Die PEI benutzt man insbesondere bei Tumoren die sehr nah an anderen, lebenswichtigen Organen liegen und wo die Ablation mittels RFA sehr riskant und schwierig ist. Die PEI wird in besonderen Situationen auch in einer Kombination mit TACE oder RFA im fortgeschrittenen HCC-Stadium und bei großen oder extrahepatischen HCC-Metastasen noch angewendet (79,80). Eine Kombination von PEI, RFA und TACE unter der Berücksichtigung der Tumorumlage, -größe, -verbreitung, -

differenzierung und -art, kann eine bessere Kontrolle des HCC erzielen als die Monotherapie (79,80,81,82,83,84,85,86).

Ein weiteres thermisches Ablationsverfahren stellt die **Kryoablation** dar, bei der das Zielgewebe mit Flüssigstickstoff oder Argon heruntergekühlt, bzw. gefroren wird (es werden Temperaturen von bis zu -180° erreicht) (87). Hierbei handelt es sich um ein hypothermes Ablationsverfahren. Die irreversiblen Gewebseffekte sind vergleichbar zu denen der hyperthermischen Verfahren. Eine schwerwiegende Komplikation stellt jedoch der sogenannte Kryoschock dar, der in 1% der Ablationen vorkommt und mit einer Mortalität bis 28% vergesellschaftet ist (88).

Die Transarterielle Chemoembolisation (TACE). Neben der Gruppe der thermischen Ablationsverfahren gibt es eine weitere große Gruppe der Ablationstechnologien, die vaskulären Ablationstechnologien. Diese Verfahren zeichnen sich durch eine regionale Applikation von chemotherapeutischen Substanzen aus. Dadurch soll die Effizienz der Chemotherapie gesteigert und die systemischen Nebenwirkungen, die bei einer konventionellen Chemotherapie auftreten, reduziert werden (89). Bei der transarteriellen Chemoembolisation wird auch die Blutversorgung des Tumors beeinflusst und dadurch kann das Wachstumsverhalten des Tumors besser kontrolliert werden (87,90). Die TACE kombiniert die intraarterielle Injektion von chemotherapeutischen Substanzen mit der Embolisation der tumorversorgenden Gefäße, mit dem Ziel, durch Devaskularisierung den Tumor von der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff abzuschneiden und ausgedehnte Tumornekrosen zu induzieren (87). Dieses Verfahren wird häufig mit einem der oben vorgestellten Verfahren (z.B. der RFA) kombiniert, um so eine Effizienzsteigerung zu ermöglichen.

Die Selektive Interne Radiotherapie (= SIRT; Yttriumtherapie)

Die SIRT ist eine sehr junge Therapieform, die derzeit bei Patienten durchgeführt werden kann, wenn keine andere Therapieoption auf Grund eines weiter fortgeschrittenen Tumorleidens besteht. Allerdings wird derzeit noch von den entsprechenden Fachgesellschaften gefordert, dass es sich bei der Erkrankung um ein auf die Leber beschränktes Tumorleiden handelt, dass der Patient über eine ausreichend gute Leberfunktion verfügt, und dass sein Bilirubin unter 2 mg/dl liegt.

Grundlage der Therapie ist, dass bei einer selektiven transarteriellen Gabe von in Kunstharz eingeschmolzenen Yttrium⁹⁰ Partikeln sehr hohe Strahlendosen direkt an den Tumor gebracht werden können. Bei Yttrium⁹⁰ handelt es sich um einen reinen Beta-Strahler mit einer Halbwertszeit von ca. 67 Stunden. Die Reichweite der Betateilchen beträgt im Gewebe nur wenige Millimeter. Die Administration des Yttriums erfolgt über einen transarteriellen Zugangsweg, wie bei der TACE. Man nutzt hier die duale Gefäßversorgung (Pfortader, Leberarterie) der Leber aus und die Tatsache, dass das HCC üblicherweise arteriell gut versorgt ist und generell die Gefäßdichte im Bereich des Tumors höher ist als im normalen Leberparenchym. So erreicht man eine sehr hohe Dosis des Yttriums im Tumor, wo hingegen die gesunde Leber nahezu keinen Schaden nimmt (91).

1.1.4.3. Die Chemotherapie oder *molecular targeted therapy* (MTT).

Bei Patienten mit lokal weit fortgeschrittener Tumorerkrankung mit Gefäßinfiltration und insbesondere beim Vorliegen einer extrahepatischen Manifestation hat keine der in den letzten Jahren im Rahmen einer systemischen Chemotherapie eingesetzten Substanzen – alleine oder als Kombinationstherapie – höhere Ansprechraten als 25% bzw. einen deutlichen Überlebensvorteil gezeigt. Dies liegt einerseits an der ausgeprägten Resistenz des HCCs gegenüber zytotoxischen Substanzen, und zum anderen an der im Regelfall zugrunde liegenden Leberzirrhose. Diese führt zu einem zu einer erhöhten Mortalität und aufgrund der eingeschränkten hepatischen Reserve ist die Aggressivität der Therapie limitiert.

Bis vor kurzem gab es keine etablierte Standardtherapie des fortgeschrittenen HCCs. Ein besseres Verständnis der molekularen Hepatokarzinogenese hat in den letzten Jahren jedoch neue Therapieansätze ermöglicht (92). Die bisher einzige etablierte Standardtherapie bei fortgeschrittenem HCC stellt das Sorafenib dar. Sorafenib ist ein oraler Multikinase-Inhibitor, der neben intrazellulären Kinasen (Raf-1/B-Raf) verschiedene Rezeptor-tyrosinkinasen inhibiert, wobei insbesondere die Hemmung von *VEGFR-2/-3* und *PDGFR-β* von entscheidender Bedeutung sind. Damit werden sowohl Signalwege im Tumor mit dem Ergebnis einer gesteigerten Apoptose als auch in der genetisch stabilen Endothelzelle blockiert.

Der Einsatz von Sorafenib wurde bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC im Rahmen einer Studie untersucht (93). Insgesamt wurden 602 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon 299 in der Behandlungsgruppe. Primärer Endpunkt war das Gesamtüberleben. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung des medianen Überlebens um 2,8 Monate (10,7 Monate mit Sorafenib vs. 7,9 Monate mit Placebo, $p=0,0077$, HR 0,69). Auch die Zeit bis zur Tumorprogression hatte sich fast verdoppelt (5,5 Monate mit Sorafenib vs. 2,8 Monate mit Placebo). Durch diese Studie konnte erstmals eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei einer systemischen Therapie des HCCs demonstriert werden.

Als Multi-Kinase und *Vascular endothelial growth factor (VEGF)* - Inhibitor, hemmt Sorafenib erfolgreich die Zellproliferation bei fortgeschrittenem HCC (94,95,96,97,98,99). Sorafenib kann entweder als Monotherapie oder mit anderen analog wirkenden neuen Medikamenten wie Sunitinib (100), Brivanib (101), TSU-68 (102) und BIBF1120, Linifanib (103), Pazopanib (104), Cediranib, Bevacizumab (105) angewendet werden. Weil das HCC ein hypervaskularisierter Tumor ist und die Angiogenese eine große Rolle bei seiner Entstehung spielt (106,107), wurde auch Thalidomid, das *VEGF* inhibiert, in der HCC-Therapie eingesetzt (108,109). Obwohl einige Studien zunächst eine positive palliative Wirkung bewiesen haben (110,111), wurde in anderen kein Benefit beobachtet. Auch wegen toxischer Nebenwirkungen wendet man Thalidomid heute nicht mehr an.

1.1.4.4. Weitere Therapieansätze

Als **Immuntherapie** wurde Interferon-alpha beim HCC mit viraler Pathogenese eingesetzt. Sein therapeutischer Effekt bleibt kontrovers. Lai et al. konnten bei hohen Dosierungen ein Ansprechen des HCC nachweisen (112,113), jedoch zeigten sich signifikante toxische Effekte bei den Patienten. Andere Studien, bei denen niedrigere Dosen von Interferon verwendet wurden, hatten keinen positiven Effekt beobachten können (114). Auch ein prophylaktischer Effekt von Interferon beim Hepatitis-B-induzierten HCC scheint ganz zu fehlen (115).

Weitere Therapieversuche werden bezüglich einer **hormonellen Therapie** durchgeführt. Obwohl in Untersuchungen in HCC-Zelllinien und Tiermodellen Tamoxifen (TMX) eine Apoptoseinduktion und einen antiproliferativen Effekt durch

direkte und indirekte Wege gezeigt hatte (116,117,118,119,120), konnten zahlreiche Studien keinen eindeutigen Effekt von Tamoxifen in der HCC-Therapie nachweisen (121,122,123,124,125,126,127,128,120). Wegen den negativen Ergebnissen wird derzeit Tamoxifen in der HCC-Therapie nicht mehr empfohlen.

Ein alternatives medikamentöses Therapieverfahren könnte die Gabe von Somatostatin-Analoga darstellen (129). Der Einsatz von Somatostatin und seinen Analoga wurden in der Therapie des HCC weltweit untersucht, jedoch bleibt die Studienlage sehr widersprüchlich (s.unten).

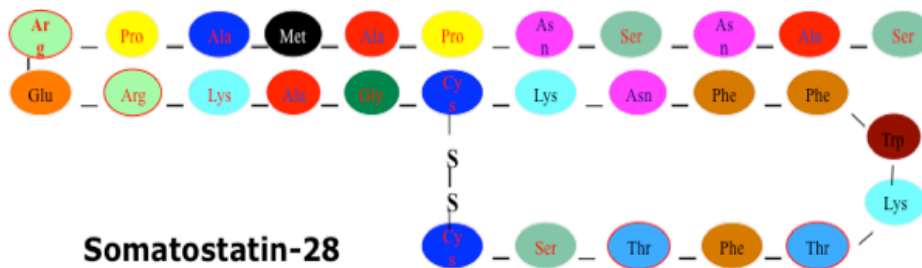
1.2. Somatostatin und seine Rezeptoren

1.2.1. Somatostatin

Somatostatin wurde 1973 von Brazeau et al. zufällig im Rahmen von Studien über das Wachstumshormon im Hypothalamus von Ratten entdeckt (130). Somatostatin ist ein Peptidhormon, das von neuroendokrinen Zellen und inflammatorischen Zellen des Immunsystems gebildet wird und eine regulatorische Funktion besitzt. Bei der Gelfiltration des hypothalamischen Extraktes von Ratten und Schafen entdeckten Kühlich und Mitarbeiter zwei Zonen, welche die Sekretion von Wachstumshormon nach der Inkubation mit Extrakt aus dem Hypophysen-Vorderlappen männlicher Ratten in unterschiedlicher Weise beeinflussten (131). In einer Zone konnten Wachstumshormone vielfach freigesetzt werden, die andere dagegen reduzierte diese auf etwa die Hälfte. Daraus entstand die Hypothese eines GH-freisetzenden und eines GH-inhibierenden Faktors im Hypothalamus von Schafen und Ratten (131). Auch Brazeau hat bei seinen Experimenten die Freisetzung des Wachstumshormons durch diesen Faktor nachweisen können. Er beobachtete, dass durch die Zugabe von hypothalamischem Extrakt zu den hypophysären Zellen von Ratten die GH-Sekretion der hypophysären Zellen gehemmt wird. Er hat es geschafft, das auslösende Peptid zu isolieren und er nannte es *Growth Hormon - Release - inhibiting Factor*. Anhand von *in vitro* Assays identifizierte er dessen Struktur (131). Das Hormon wird aus Vorläuferproteinen durch enzymatische Spaltung hergestellt (132), wobei zwei verschiedene biologisch aktive Formen, Somatostatin-14 und Somatostatin-28 (Abb.1) nach der Anzahl der vorhandenen Aminosäuren bezeichnet, entstehen.



Somatostatin-14



Somatostatin-28

Abb. 1. Somatostatin-Moleküle, die aus 14 und 28 Aminosäuren bestehen, sind zyklische *Tetradecapeptide* (nach Patel) (132).

Allmählich wurden verschiedene weitere Wirkungen von Somatostatin entdeckt. Somatostatin vermindert die Resorption von Nahrungssubstraten und Elektrolyten, sowie die Kontraktion der Magen-, Darm- und Gallenblasenmuskulatur, hemmt die exokrin-sekretorische Funktionen der Speicheldrüsen, des Magens, Dünndarms, Pankreas und der Leber (133,134). Es inhibiert die Freisetzung pankreatischer und gastrointestinaler Hormone wie Insulin, Glukagon, Gastrin, Sekretin und VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*)(135).

1.2.1.1. Die Rolle von Somatostatin im Zellzyklus und in der Apoptose

Somatostatin führt zur Inhibition der Zellproliferation in gesundem und entartetem Gewebe und somit zur Suppression des Wachstums verschiedener endokriner Tumoren wie Wachstumshormon-sezernierenden Adenomen, Gastrinomen, Insulinomen, Glukagonomen und Vipomen (135,132). Eine Inhibition der Proliferation von Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt durch Somatostatin wurde ebenfalls beschrieben (136). Dieser das Wachstum von gesunden Zellen und Tumorzellen hemmende Effekt entsteht durch direkte antiproliferative Effekte wie der Modulation von Map-Kinasen und des pro-apoptotischen Proteins Bax und durch indirekte Faktoren wie die Hemmung der Sekretion von Wachstumsfaktoren (137,138,139,140,141), Hemmung der

Angiogenese und Modulation des Immunsystems über Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose (142,143,144).

1.2.1.2. Das Somatostatinanalogon Oktreotid und seine Wirkung in Zelllinien und in Tiermodellen

Der klinische Einsatz von Somatostatin wird durch seine sehr kurze Halbwertszeit von unter drei Minuten bei intravenöser Applikation stark eingeschränkt (145), so dass für den therapeutischen Einsatz nach Alternativen gesucht wurde.

Ein länger wirksames Analogon ist Octreotid mit einer Eliminationshalbwertszeit von zwei Stunden nach subkutaner Gabe. Octreotid ist strukturell ein kurzes, synthetisch hergestelltes *Octapeptid* (Abb. 2) (132).

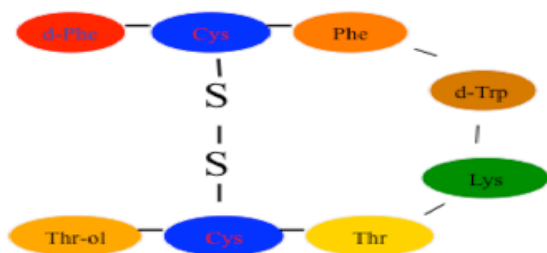


Abb. 2. Oktapeptid-Molekül von Octreotid (nach Patel) (132).

Octreotid zeigt eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation und induziert die Apoptose sowohl von gesunden, als auch von Tumorzellen. Das lang wirkende Octreotid SOM-230 (Somatostatin-Analogon Pasireotid (lang wirkende cyclohexapeptide mit Somatostatinähnlichen Wirkung), zeigt 5-40 Mal stärkerer Affinität zu SSTR5-1 als Oktreotid (209)) inhibiert *in vitro* das Zellwachstum beim Phäochromozytom und induziert Apoptose (146). Es führt bei adrenalen Tumoren zu einer Hemmung der Hormonsekretion (147). Einige Untersuchungen *in vitro* zeigen auch die Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten (148). Ferone et al. konnten zeigen, dass Oktreotid *in vitro* die Proliferation von Thymoma-Tumorzellen hemmt (149). Auch über eine *in vitro* Inhibition des Wachstums und des Zellzyklus sowie eine Apoptoseinduktion in Mamma-Ca-Zellen wurde berichtet (150). Die Wachstumshemmung erfolgt wie beschrieben durch direkte antiproliferative Effekte und durch indirekte Faktoren, wie die Hemmung der Sekretion von Wachstumsfaktoren, Hemmung der Angiogenese und Modulation des

Immunsystems (151,152,153,154,155). Octreotid führte zur Tumorregression und Apoptoseinduktion von Tumorzellen und in Tiermodellen bei Nacktmäusen und immundefizienten Mäusen (156,157,158).

Der Einsatz von Octreotid wurde auch in HCC-Modellen getestet. Hua et al. konnten zeigen, dass die Therapie mit *Short-term OCT* (kurzwirksames Octreotid) zu einer Desensibilisierung des SSTR2-Rezeptors und somit zur Reduktion des inhibitorischen Effektes auf das HCC führt, während die Therapie mit *Long-term OCT* (langwirksames Octreotid) die SSTR2-mRNA- und Proteinexpression ansteigen lässt und die HCC-Entwicklung und Wachstum *in vivo* bei Raten inhibiert (159). Weitere Studien zeigten ebenfalls, dass Octreotid das HCC-Wachstum durch Angiogenesehemmung inhibiert (143,144).

1.2.1.3. Octreotid in der Therapie bei Patienten mit HCC

Die Studienlage bezüglich des Therapieerfolges der Octreotid-Therapie beim HCC ist derzeit immer noch widersprüchlich. Während einige Studien einen Überlebensvorteil, eine Stabilisierung oder eine Progressverzögerung beschreiben, konnte in anderen Untersuchungen kein Therapieansprechen belegt werden. Einigen Studien berichten über einen antiproliferativen Effekt und eine Tumorregression (151,160,161,162) sowie eine Lebenszeitverlängerung und eine Verbesserung der Lebensqualität (163,164,165). Es gibt einzelne Fallberichte über spektakuläres Ansprechen von Patienten mit HCC auf eine Therapie mit Octreotid: bei einem Patienten, der nicht mehr für eine operative Behandlung geeignet war, zeigte sich nach 10 Monaten Therapie mit Octreotid bei einer Kontroll-CT-Untersuchung eine komplette Tumorregression eines multifokalen HCC mit max. 5cm Größe (166). Bereits nach 4 Monaten-Therapie gab es schon eine 50-70% Reduktion des Tumolvolumens. AFP war von 7615,3 ng/ml auf 33,1 ng/ml gesunken (166). In einem weiteren Fallbericht aus Frankreich kam es bei einem 54-jährigem Patienten mit einem nicht-operablen multifokalen HCC nach 39 Monaten Therapie zu einer signifikanten Tumorregression bis zur völligen Reduktion und eine AFP-Senkung von 40,327 ng/ml auf 1 ng/ml (167).

Die HECTOR-Studie, eine randomisierte, kontrollierte, doppelblind-Studie zum Einsatz von Octreotid beim HCC hat jedoch keinen Überlebensvorteil für die behandelten Patienten nachweisen können (s. Abb. 3) (168).

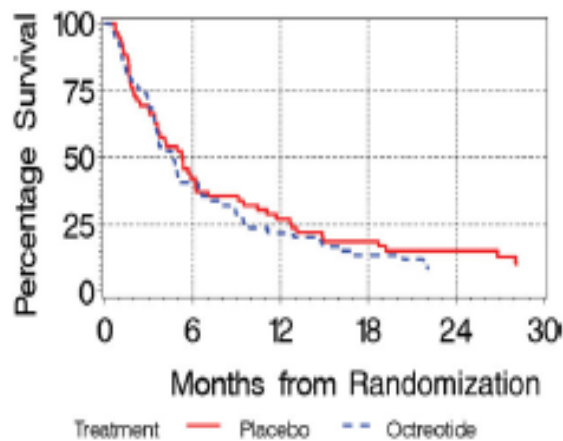


Abb.3. Ergebnisse der HECTOR-Studie zum Einsatz von Octreotid beim HCC (nach 168): eingeschlossen wurden 120 HCC-Patienten, davon wurden 60 Patienten mit Sandostatin-LAR 30 i.m. alle 4 Wochen und 59 Patienten mit Placebo behandelt.

Eine weitere Studie, bei der nur HCC-Patienten mit Indium¹¹¹ positiver Szintigraphie mit Octreotid behandelt worden sind, berichtet auf der anderen Seite über einen Therapieerfolg (169, s. Abb. 4).

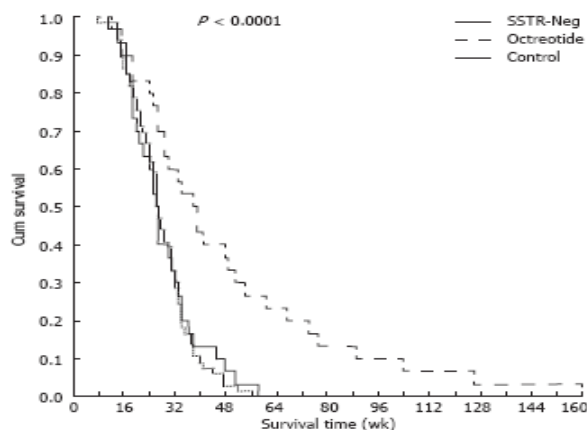


Abb.4. Ergebnisse der randomisierten, placebo-kontrollierten Untersuchung vom Dimitroulopoulos et al. (169): eingeschlossen wurden 127 HCC-Patienten, davon fungierten 66 Szintigraphie-negative Patienten als Kontrollen, 30 Szintigraphie-positive Patienten wurden mit Sandostatin 0,5 mg alle 8h, dann LAR30 i.m. alle 4 Wochen und 59 Patienten mit Placebo behandelt.

Diese Beobachtung spricht dafür, dass sich die divergenten Ergebnisse bisheriger Publikationen möglicherweise durch die Heterogenität des Patientenguts hinsichtlich des Somatostatinrezeptor - Status erklären lassen.

1.2.2. Somatostatinrezeptoren

Bis heute sind 5 Typen von Somatostatinrezeptoren (SSTR) beschrieben worden. Sie gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren, die in ihrer Aminosäuresequenz 40% bis 60% identisch sind. Die SSTR₁ und SSTR₂ wurden aus menschlicher Inselzell-RNA geklont (170). Die Expression der fünf

Somatostatinrezeptoren wurde in verschiedenen Gewebetypen und auch in unterschiedlichen Tumoren nachgewiesen (171). Einige Tumoren exprimieren alle 5 Rezeptor-Subtypen gleichzeitig (172,173). Sowohl das HCC, als auch die kolorektalen Tumore, Brust-, Pankreas-, Lungen- und Prostatakarzinome exprimieren Somatostatinrezeptoren (174). Endokrine Tumoren exprimieren diese Rezeptoren in großer Dichte. Eine Expression von SSTR wurde beispielsweise bei Hypophysenadenomen, endokrinen Pankreastumoren, Karzinoiden, Paragangliomen, Phäochromozytomen, medullären Schilddrüsenkarzinomen, Mammakarzinomen und Lungentumoren, sowie malignen Lymphomen nachgewiesen (175,176,177,178). Bei endokrinen Pankreastumoren und Tumoren des Verdauungstraktes ist die Somatostatinrezeptor-Expression vielfältig, jedoch dominieren hier die SSTR₂ mit einer Expression in über 80 % der Tumore (179,180,181,182). Bei Gehirntumoren sind auch alle 5 Somatostatinrezeptoren-Subtypen expremiert, jedoch zeigen SSTR₂ und SSTR₁ die intensivste und reichste Expression (183) (Abb 5).

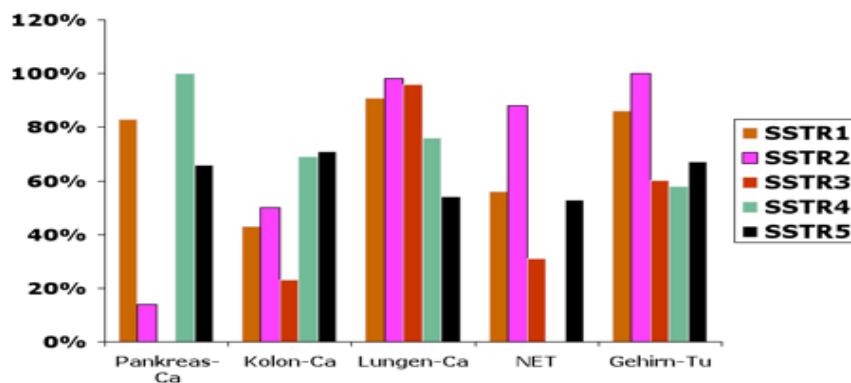


Abb. 5. Expression von Somatostatinrezeptoren in verschiedenen Tumorentitäten (nach 183,184).

Die Funktion der SSTR ist nur teilweise bekannt. SSTR₂ und SSTR₅ sind an der Regulation der GH-Freisetzung beteiligt. Außerdem ist SSTR₅ vermutlich in der Regulation der Insulin- und wahrscheinlich auch Glukagonsekretion impliziert. Durch die Stimulation von SSTR₃ und SSTR₂ konnte in unterschiedlichen Zelltypen Apoptose induziert werden. Die Inhibition der Zellproliferation und die dadurch verursachte Tumorregression erfolgt über eine Aktivierung von SSTR₁, SSTR₂ und SSTR₅. Es wird vermutet, dass SSTR₁ auch in der Angiogenese beteiligt ist. Die Funktion von SSTR₄ ist weitgehend unbekannt (185).

Durch die Bindung von Somatostatin an den zugehörigen Rezeptoren werden „*second messenger Systeme*“ aktiviert. Dadurch wird Adenylatzyklase gehemmt, Kalziumkanäle

aktiviert und die Phosphotyrosin-Phosphatase oder MAP (*Mitogen activated Protein*) - Kinase stimuliert. Somatostatin-14 und Somatostatin-28 zeigen für alle der fünf Rezeptor-Subtypen eine hohe Affinität, wobei SSTR-4 eine etwas stärkere Affinität für Somatostatin-14 und SSTR₅ eine 10-15 mal stärkere Affinität für Somatostatin-28 aufweist (186).

1.2.2.1. Expression von Somatostatinrezeptoren beim HCC

Eine Expression von Somatostatinrezeptoren wurde auch beim HCC *in vitro* beschrieben (187,188,151). Reynaert et al. zeigten immunhistochemisch in HCC-Zellen eine intensive SSTR-Expression, insbesondere von SSTR₁, während bei gesunden Kontroll-Leberzellen keine Expression beobachtet werden konnte. Jedoch wurde mRNA von allen Rezeptor-Subtypen sowohl in normalen Leberzellen als auch in HCC-Zellen detektiert (189).

Auch Bläker et al. haben die Expression von SSTR-Subtypen im HCC untersucht. Die Autoren konnten eine Expression von SSTR₁ in 46%, von SSTR₂ in 41%, SSTR₃ in 64%, SSTR₄ in 0%, und SSTR₅ in 75% der HCC nachweisen. Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen der SSTR-Expression und Tumorstadium, Differenzierung, histologischem Subtyp oder zugrunde liegender Lebererkrankung beobachtet (s. Abb.6) (190).

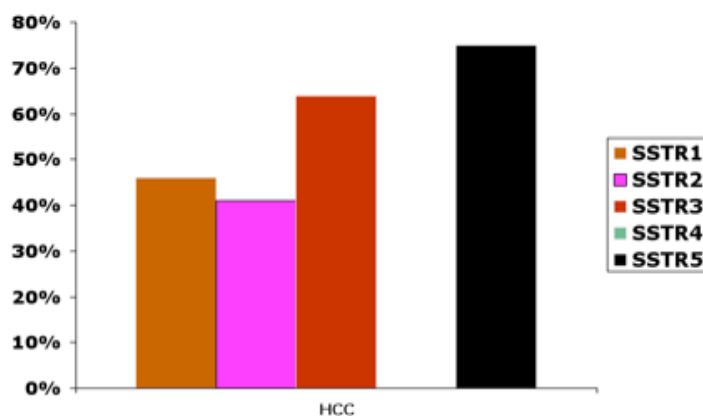


Abb.6. Expression von SSTRs im HCC-Gewebe (nach 190): Die Expressionsrate lag hier bei 46% für SSTR₁, 41% für SSTR₂, 64% für SSTR₃ und 75% für SSTR₅.

1.2.2.2. Polymorphismen in den Genen für die Somatostatinrezeptoren

In den Genen für die SSTRs wurden mehrere Polymorphismen beschrieben und deren Verteilung bei unterschiedlichen Krankheitsbildern untersucht.

Filopanti et al. untersuchten nach einer möglichen Korrelation von Einzelnukleotidpolymorphismen (*SNP*) in den Genen für SSTR₂ und SSTR₅ mit dem Ansprechen auf eine Therapie mit Somatostatinanaloga bei Patienten mit Akromegalie. Die Autoren fanden heraus, dass SSTR₁ und SSTR₂ Genotypvariationen den GH und den IGF-I Serumwert bei Patienten mit Akromegalie beeinflussen können (191). Weitere Untersuchungen von Sotos-Prieto et al. zeigten eine Assoziation eines *SNP* im SSTR₂-Gen mit dem *body mass index* (BMI) und der Essensaufnahme bei 945 Personen mit kardiovaskulärem Risiko (340 Männer und 605 Frauen)(192). Auch eine Assoziation von Genvariationen im SSTR₅ mit dem Risiko der Entstehung und Progression von Pankreasneoplasien wurde beschrieben (193).

Von Interesse bezüglich einer Assoziation mit Krankheitsbildern, Therapieansprechen und weiteren phänotypischen Merkmalen sind neben den *SNP* auch Mikrosatelliten-Polymorphismen. Mikrosatelliten-DNA sind kleinere wiederholende DNA-Abschnitte, bzw. 10-50 Kopien von Folgen aus 1-6 Basenpaaren, die sich häufig direkt hinter kodierenden Regionen oder in Intronbereichen befinden. Sehr oft kommen Mikrosatelliten mit *CA (TG)*-Dinukleotidwiederholungen vor. Die Besonderheit von diesen Mikrosatelliten mit *CA-repeats* besteht darin, dass diese sehr empfindlich sind und mehr Fragilität als andere Satelliten aufweisen. Diese Genregionen erleben am häufigsten Polymorphie und Mutationen. Die zwei Allele eines Chromosoms unterscheiden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zahl der Dinukleotide. Weil die Mikrosatelliten sich in den nicht kodierenden Bereichen befinden, wurde früher angenommen, dass sie keine Bedeutung für das Individuum haben. Später wurde herausgefunden, dass diese Sequenzwiederholungen sich verkürzen oder verlängern können und sich damit positiv oder negativ, sogar lebensbedrohlich, auf den Organismus auswirken können (194,195). Die Mikrosatelliten können Effekte auf Rekombination, DNA-Replikation, Zellzyklus, *Mismatch repair system*, Transskription, Translation und Proteinbindung ausüben. Yamada et al. haben die für SSTR₁, SSTR₂ und SSTR₃ kodierende Gene (14q13, 17q24 und 22q13.1) speziell nach solchen tandem-repeat-Polymorphismen untersucht und Mikrosatellitenpolymorphismen in SSTR₁ und

SSTR₂ nachweisen können (196). In einer groß angelegten Studie mit 798 Patienten mit Brustkrebs und 1011 Kontrollpersonen konnte unter anderem eine protektive Wirkung eines bestimmten Genotyps bzgl. des *TG-tandem-repeat* Mikrosatellitenpolymorphismus im SSTR₂ (21/22 *TG repeat*) beschrieben werden (197). Die beschriebenen *dinukleotid-Tandem repeat* Polymorphismen im SSTR₁ und SSTR₂ wurden in einer weiteren unabhängigen Studie bei Patienten mit Brustkrebs (N=109, Kontrollen N=109) und aktinischer Keratose (N=150, Kontrollen N=150) untersucht (198). Hier konnten die Autoren keine Assoziation dieser Polymorphismen mit dem Erkrankungsrisiko beobachten.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

In den Genen für die Somatostatinrezeptoren 1 und 2 (SSTR₁ und SSTR₂) wurden jeweils *(CA)_n-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismen beschrieben, welche möglicherweise funktionelle Bedeutung haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle dieser beiden *(CA)_n-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismen im SSTR₁ und SSTR₂ in der Suszeptibilität für das HCC. Eine Fallkontrollassoziationsstudie sollte die Frage klären, ob die Mikrosatellitenpolymorphismen mit dem Krankheitsbild des hepatozellulären Karzinoms assoziiert sind. Hierzu sollten die beiden Polymorphismen in einer Gruppe von Patienten mit HCC und in einer Gruppe aus gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen untersucht werden. Durch den Vergleich der Verteilung der Polymorphismen in den beiden Gruppen sollte herausgefunden werden, ob eine signifikante Assoziation dieser Varianten mit dem HCC vorliegt. Dazu wurden die Allel- und Genotypfrequenzen für die untersuchten Polymorphismen in der betreffenden Patientengruppe mit den Frequenzen in der gesunden Kontrollgruppe mittels statistischen Tests verglichen.

2. Material

2.1. Studienpopulation

2.1.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 93 Patienten mit HCC. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Proben-Entnahme in stationärer Betreuung im Klinikum der Universität Regensburg oder München. Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie war eine histologisch gesicherte Diagnose eines HCC. Als Material diente DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe von Tumor- oder nicht Tumorbereichen der Leber. Teil der DNA-Proben stammen aus Gewebeproben von der Forschungsstiftung "Human Tissue an Cell Research" (HTCR) und wurden uns im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Claus Hellerbrand (Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt. Die restliche Gewebeproben (bzw. Paraffinschnitte) stammen aus dem Institut für Pathologie des Klinikum der Universität München.

2.1.2. Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv umfasste 157 gesunde Blutspender. Als Material wurde hier Leukozyten-DNA verwendet.

2.2. Kits und Chemikalien

2.2.1. Materialien für die DNA-Isolierung

Tab.1. Materialien für die DNA-Isolierung

Material	Firma
Ethanol absolut	Merck
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck
Proteinase K	Qiagen
QIAamp→DNA Blood Mini Kit+Eigene Kit	Qiagen
Erythrozyten-Lyse-Puffer (155mM NH ₄ Cl, 400mM NaCl, 1mM EDTA)	Eigenherstellung Apotheke KUM
Kernlysepuffer (10mM Tris/HCl pH 8, 400mM NaCl, 10mM EDTA)	Eigenherstellung Apotheke KUM
Gesättigte Natriumchloridlösung (5M NaCl) Natriumdodecylsulfat-Lösung 20%	Eigenherstellung Apotheke KUM
TE-Puffer (10mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA)	Eigenherstellung Apotheke KUM

2.2.2. Materialien für die Polymerasekettenreaktion (PCR) und für die Reinigung der PCR- Produkte

Tab.2. Materialien für die PCR und für die Reinigung der PCR-Produkte

Material	Firma
- Aqua ad injectabilia	Braun
- Deoxynukleotid-Mix (dNTP, je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma
- HotStarTaq™ DNA-Polymerase	Qiagen
- QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen

2.2.3. Oligonukleotide

Für die Typisierung der *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismen in den Genen für SSTR₁ und SSTR₂ wurden folgende Primerpaare verwendet (Tab. 3), wobei der 5'-Primer fluoreszent markiert war:

Tab. 3. Verwendete Primer für die Typisierung der *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismen in den Genen für den SSTR₁ und SSTR₂

Primer	Nukleotidsequenz
SSTR ₁ -F-Fam	5'-CAGATGTATTATGCTGTTGC-3'
SSTR ₁ -R	5'-CCTAAGTGACAAGTAAGTC-3'
SSTR ₂ -F-Fam	5'-AGCTAGCGGATTGCAGCGGA-3'
SSTR ₂ -R	5'-AGCGCAGATGCACACAGGTG-3'

Für die Sequenzierung der Proben welche als „Goldstandarts“ verwendet wurden, wurden zusätzlich folgende Primer verwendet.

Tab.4. Zusätzlich verwendete 3' bzw. 5' -Primer für die Sequenzierung

SSTR ₁ -Is3	5'-AGGGTATAACCACAACTTGG-3'
SSTR ₂ -Seg5	5'-ACAAGAGGGTCGAGGAGCCAGG-3'

Für SSTR₁ wurde als 5'-Primer der Primer SSTR₁-F ohne Fam-Markierung verwendet.

2.3. Geräte

Tab.5. Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Brutschränke	Memmert und Techne
Elektrophoresekammer Sub-cell	GT, BioRad
Mikrowelleofen	Bosch
Mikrozentrifuge Modell SD und AL	Roth
Polaroidkamera	MP-4 Land Camera
Spannungsquelle Power Pac 300	BioRad
Spectrophotometer GeneQuant pro	Amersham Pharmacia
Thermocycler Uno-Thermoblock	Biometra
Tischzentrifuge Universal 30RF	Hettich
UV-Transilluminator LK	Bromma
Vortex-Schüttler	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge Rotixa/P	Hettich
Kapillarequenzierer	3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems

3. Methoden

3.1. Allgemeine Vorgehensweise

In dieser Studie wurden zwei *CA-dinukleotid-tandem repeat* Polymorphismen in den Genen für SSTR₁ und SSTR₂ untersucht.

Als Ausgangsmaterial wurde Blut- und Gewebe-DNA verwendet. Die Genotypisierung der Polymorphismen erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, s. Punkt 3.2.3) mit anschließender Fragment-Längen-Analyse (s. Punkt 3.2.6). Dieses Verfahren basiert auf der Amplifizierung eines DNA-Abschnittes, welches den tandem-repeat-Polymorphismus enthält, mittels PCR unter Verwendung eines fluoreszenz-markierten Primers und eine anschließende Elektrophorese und Fragment-Längen-Analyse auf einem automatischen Sequenzer. Da sowohl Tumor-DNA als auch nicht-Tumor-DNA von Patienten mit HCC verwendet wurde, wurde es zusätzlich in einigen gepaarten Proben von Tumor- und nicht Tumorgeweben nach Mikrosatelliteninstabilität in den 2 Loci getestet.

Für die richtige Zuordnung der Allele wurden bei der Untersuchung der tandem-repeat-Polymorphismen sog. „Goldstandards“ etabliert. Für die Etablierung von Standards wurden Proben mit einem „homozygoten Laufmuster“ in der Fragment-Analyse ausgewählt. Bei diesen Proben wurde der Anzahl an *CA-repeats* mittels Sequenzierung bestätigt. Die entsprechenden DNA-Proben wurden folglich bei jedem PCR-Lauf und anschließend bei jeder Fragment-Längen-Analyse als Standards mitgeführt.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Blutproben

Die Blutproben wurden in 10 ml EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Röhrchen wurden am selben Tag bei 2000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert und das überstehende Plasma abpipettiert. Die Isolierung der genomischen DNA aus Blut erfolgte entweder mit Hilfe der Aussalzmethode oder mittels eines kommerziellen Kits (QIAamp→ DNA Blood Mini Kits, Qiagen), wie bereits vorbeschrieben (199).

3.2.2. Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben

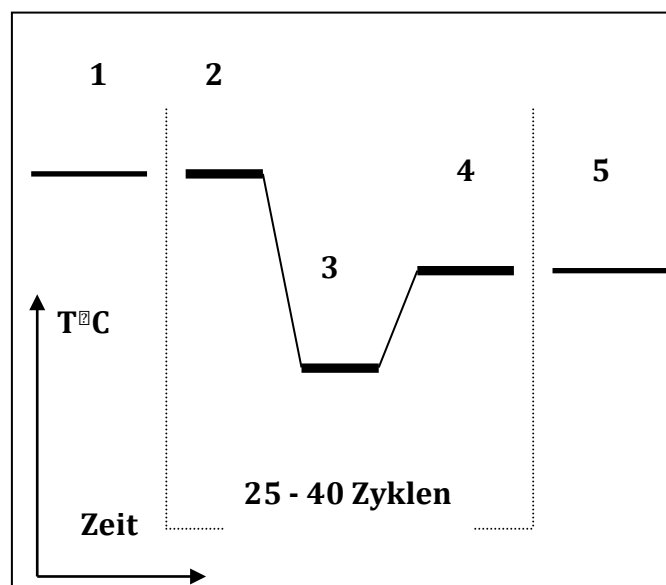
Das Protokoll wurde auf 25 mg Gewebe angewendet, das direkt vom tiefgefrorenen Tumorblock entnommen wurde. Dazu wurden der Gewebeprobe 180 µl ATL-Puffer (Qiagen) und 20 µl Proteinase K (Qiagen) in einem 2 ml Eppendorfgefäß zugegeben und der Ansatz bei 55 °C über Nacht inkubiert, bis das Gewebe vollständig aufgelöst war. Anschließend wurden der Lösung 200 µl AL-Puffer (Qiagen) zugegeben und zusammen für 10 min bei 70 °C inkubiert. Zur Ausfällung der DNA wurden schließlich 210 µl Ethanol 96-100% zugegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend zur Bindung der DNA an die Säulenmembran über eine in dem Extraktionskit enthaltene Filtersäule bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Zum Reinigen der DNA wurde die Filtersäule mehrmals mit 500 µl Puffer AW (Qiagen) aufgefüllt und zentrifugiert. Die nun im Filter isolierte DNA wurde mit 200 µl 10 mM TRIS inkubiert und durch erneute Zentrifugation eluiert.

3.2.3. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der gezielten Vermehrung (Amplifikation) von DNA - Fragmenten (bis ca. 20 kb). Eine klassische Reaktionsfolge ist schematisch in der Abb. 7. dargestellt.

Abb. 7: Schematische Darstellung der Reaktionsfolge bei der PCR.

1. Anfangsdenaturierung bei 95 °C, 5-15 Minuten
2. Denaturierung bei 94 °C, 30 Sekunden
3. Primer-Annealing primerabhängig bei 50-68 °C, 30 Sekunden
4. Extension bei 72 °C, Dauer abhängig von der Produktlänge
5. Endextension bei 72 °C, 10 Minuten



Anfangs erfolgt eine einmalige Denaturierung von 5-15 Minuten je nach verwendeter Taq-DNA-Polymerase (1.). Danach folgt die Amplifikation der PCR-Fragmente durch 25-40 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für meist 30 Sekunden (2.), Primeranlagerung bei der für das betreffende Primerpaar optimalen Temperatur für ebenfalls meist 30 Sekunden (3.) sowie die Extension bei 72 °C für eine von der Länge des Amplifikats abhängigen Dauer, mindestens jedoch 30 Sekunden (4.). Der letzte Schritt ist die Endextension bei 72 °C für 10 Minuten, bei der alle noch nicht komplett amplifizierten PCR-Produkte vervollständigt werden sollen (5.).

Ein PCR-Ansatz setzt sich aus einem PCR-Puffer, einem aus den vier Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) zusammengestellten Mix, den beiden für die Zielsequenz spezifischen Oligonukleotid-Primern, Magnesiumchloridlösung zur Einstellung der durch Austestung ermittelten optimalen Mg^{2+} -Konzentration, der Taq-DNA-Polymerase, speziell gereinigtem Wasser zur Einstellung des Gesamtvolumens sowie der als Matrize dienenden Ausgangs-DNA. Bei jedem PCR-Ansatz wird eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt der Ausgangs-DNA mitgeführt.

Für die PCR wurde eine Heissstart DNA-Polymerase (HotStarTaq™ DNA-Polymerase, Qiagen) verwendet, welche hitzelabile Schutzgruppen trägt und erst durch eine Inkubation bei 95 °C für 15 Minuten aktiviert wird. Zu dem PCR-Mix wurde genomische DNA zu einer Endkonzentration von 5 ng/ml zugegeben. Die erwartete Anlagerungstemperatur der Primer („Primer-Annealing“) wurde anhand der Schmelztemperaturen (T_m) der beiden Oligonukleotide berechnet (in der Regel 5 °C unter der Schmelztemperatur). Die optimale Annealingtemperatur wurde durch Austestung von mindestens drei verschiedenen Temperaturen ermittelt. Die PCR wurde entsprechend dem oben angegebenen Reaktionsschema in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden 35 Amplifikationszyklen mit einer Extensionszeit von 30 Sekunden durchgeführt. Die $MgCl_2$ -Konzentrationen sowie die Primer-Annealingtemperaturen sind der Tabelle 6. und 7. zu entnehmen.

Für die Typisierung der *tandem-repeat* Polymorphismen im SSTR₁ und SSTR₂ wurden PCR Produkten zwischen 124 und 162 bp für SSTR₁ und 127 und 141 bp für SSTR₂ (entsprechend der Anzahl an *CA-repeats*) hergestellt. Es wurden weiter für die Polymorphismen wie oben beschrieben, Proben mit homozygotem Laufmuster als Goldstandard mittels Sequenzierung durch ein kommerzielles Sequenzierunternehmen bestätigt. Diese Proben wurden dann als Kontrollen in jeder PCR mitgeführt. Für die

Sequenzierung wurden längere PCR-Produkte zwischen 185 und 223 bp fuer SSTR₁ und 242bp und 256bp für SSTR₂ hergestellt, welche die repeat tandem Polymorphismen beinhalteten (s. Abb. 8 und 9)

5'-gtgaaatttcaaatcaaatcttaattattatcttcttaagaggatatacaaattagtgctcttaa**cttg**ttaccattgtaatt
aactaaataaa**cagatgtattatgctgttgc**aagttgttttgcatttgaattttattgtttcaatggattacttggaacacacaca
cacacacacacacacacacactagcttagtt**gacttactgtcacttagg**tttaagaagaatgttttcagattactttggg
aattttaa**ccaagtttgtggttataccct**gaattattttgttaaaaagaaaagt-3'

Abb.8. Gensequenz für die jeweils amplifizierten Produkte für die Typisierung und Herstellung der Produkte für Sequenzierung für den SSTR₁-CA-tandem repeat Polymorphismus. Rot: Bindungsstelle der Primer für die Fragmentanalyse (Typisierung), blau: Bindungsstelle der Primer für die Herstellung der PCR-Produkte für die Sequenzierung.

[illegible]

Abb. 9. Gensequenz für die jeweils amplifizierten Produkte für die Typisierung und Herstellung der Produkte für Sequenzierung für den SSTR₂-*tandem repeat* Polymorphismus. Rot: Bindungsstelle der Primer für die Fragmentanalyse (Typisierung), gelb: Bindungsstelle der Primer für die Herstellung der PCR-Produkte für die Sequenzierung.

Die Reaktionsbedingungen sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

Tab. 6. Verwendete Primer und Bedingungen für die Typisierung der Polymorphismen

Polymorphismus	Name des 5' -Primers	Name des 3' - Primers	Produktlänge (bp)	Annealing T°C	MgCl ₂ Konzentration
<i>SSTR₁ CA-dinukleotid-tandem repeat</i> Fragmentanalyse	SSTR ₁ -F-Fam	SSTR ₁ -R	124-162bp	50°C	2,5mM
<i>SSTR₂ CA-dinukleotid-tandem repeat</i> Fragmentanalyse	SSTR ₂ -F-Fam	SSTR ₂ -R	127-141bp	60°C	2,5mM

Tab. 7. Verwendete Primer und Bedingungen für die PCR zur Herstellung der Produkte für die Sequenzierung der Goldstandards

Polymorphismus	Name des 5' -Primers	Name des 3' - Primers	Produktlänge (bp)	Primer-Annealing T°C	MgCl ₂ Konzentration
SSTR ₁ CA-dinukleotid-tandem repeat Sequenzierung	SSTR ₁ -F-5	SSTR ₁ -Is-3	185-223 bp	50 °C	2,5 mM
SSTR ₂ CA-dinukleotid-tandem repeat Sequenzierung	SSTR ₂ - Seq5	SSTR ₂ -R	242-256 bp	60 °C	3,5 mM

3.2.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde hier sowohl vor der Fragmentanalyse als auch vor der Sequenzierung als Kontrolle für ein erfolgreiches Amplifizieren verwendet. Die Agarosegelelektrophorese dient zur horizontalen Auftrennung von Doppelstrang-DNA-Fragmenten nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Die verschiedenen langen DNA-Fragmente wandern durch die Gelporen des Agarosegels wie durch ein Sieb. Das Gel wird horizontal in eine Kammer mit einer Pufferlösung eingelegt, an die ein Spannungsfeld angelegt wird. Die negativ geladenen Nukleinsäuren bewegen sich dabei zu der positiv geladenen Anode. Da kleinere Fragmente schneller durch die Poren laufen, kann durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard die Größe ermittelt und die Konzentration grob abgeschätzt werden. Sichtbar werden die Banden durch Interkalation des in UV-Licht orange fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid, der an die DNA bindet. Der Farbstoff wird zur Gellösung und/oder zum Laufpuffer zugegeben. Möglich ist auch eine Färbung nach der Elektrophorese. Verwendet wurde eine Agarosekonzentrationen von 2%.

Die entsprechende Menge Agarose in 200 ml oder 250 ml 1 × TBE-Puffer wurde durch Kochen in einem Mikrowellenofen vollständig gelöst. Ausschliessend wurden 3 µl bzw. 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) zugegeben und gemischt. Danach wurde die Gellösung in einen Gelträger (15 × 25 cm) gegossen, in den vier Gelkämme mit jeweils 20 Zähnen bereits vor dem Gießen oder erst danach eingesetzt wurden. Nach dem Erstarren wurden die Kämme vorsichtig gezogen und der Gelträger in die mit Laufpuffer (1 × TBE-Puffer mit 0,3 mg/ml Ethidiumbromid) gefüllte Gelkammer gestellt. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{4}$ Volumen Auftragspuffer gemischt und aufgetragen

(Ladevolumen ca. 15 - 20 ml). Zusätzlich wurden in einer am Rand gelegenen Spur 20 ml einer 100 bp-Leiter (4 ml Orange G + 2 ml (400 ng DNA) Leiter + 14 ml H₂O) als Größenstandard aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 100-120 Volt für 1,5-2 Stunden. Das Gel wurde schließlich auf dem UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert (Abb.10).

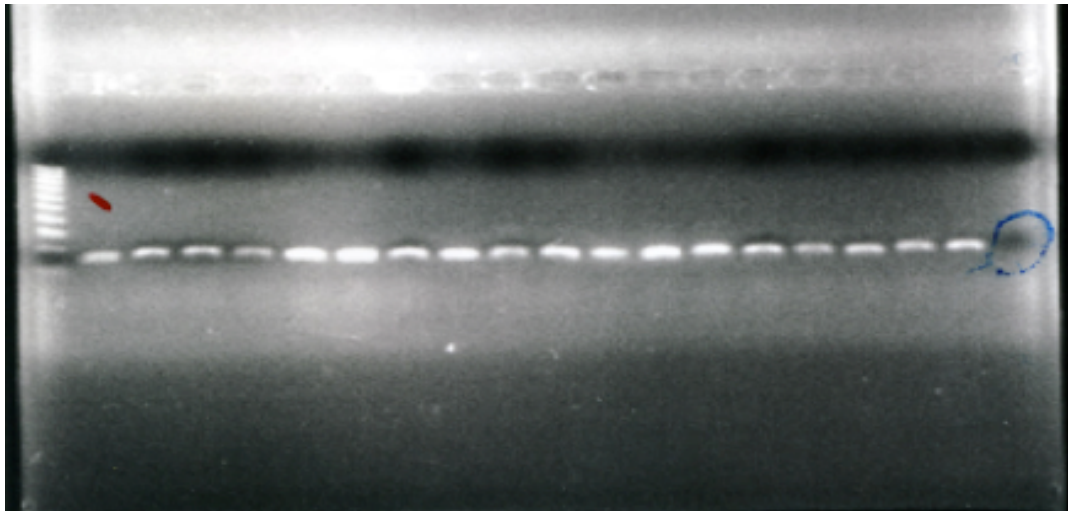


Abb. 10. Abbildung eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht. Hier ist eine erfolgreiche Amplifikation der für die Fragmentanalyse des SSTR-2-Polymorphismus benötigten PCR-Produkte bei allen 18 Proben zu sehen. Die erste Spur ist für die 100bp DNA-Leiter die letzte Spur (mit blau gekreist) für die Negativkontrolle (ohne DNA).

3.2.5. Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung.

Die PCR-Produkte, welche für die Sequenzierung hergestellt worden sind, wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) gereinigt. Mit Hilfe dieser Reinigung können die restlichen nicht eingebauten Primer sowie Primerdimere und andere Reagenzien aus der PCR effizient entfernt werden. Der Kit ermöglicht die Reinigung doppelsträngiger DNA-Fragmente einer Größe von 100 bp bis 10 kb.

Für die Reinigung wurden die PCR-Produkte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 Volumen des im Kit erhaltenen Bindungspuffers PB versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Lösung auf die dafür vorgesehene Säule aufgetragen und für 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugiert. Die in der Lösung erhaltene DNA bindet hierbei an der Silica-Gel-Matrix der Säule. Zum Waschen wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule geladen, für 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um möglichst alle Reste des ethanolhaltigen Puffers PE zu beseitigen, wurde ein

zusätzlicher Zentrifugationschritt für 1 Minute bei 13000 Upm durchgeführt. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein neues sauberes 1,5 ml-Gefäß plaziert und 40-60 ml Elutionspuffer EB direkt auf die Membran der Säule aufgetragen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 13000 Upm. Die so gewonnen PCR-Produkte wurden durch ein kommerzielles Sequenzierunternehmen sequenziert.

3.2.6. Fragmentlängenanalyse für die Typisierung der SSTR *tandem-repeat* Polymorphismen

Für eine Fragmentanalyse wurde der entsprechende DNA-Abschnitt unter Verwendung eines Fluoreszenz-markierten „Primers“ mittels PCR vervielfältigt (S.Punkt 3.2.3.). Die so erhaltenen DNA-Fragmente konnten danach mittels Kapillar-Gelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt und die Laufmuster der Proben miteinander verglichen werden. Die Fragmentanalyse wurde auf einem automatischen Sequenzierer (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystem) durchgeführt. Es handelt sich hier um einen Kapillarsequenzierer mit vier Kapillaren.

Als Amplifikationskontrolle wurden aus jedem PCR-Ansatz (s. Punkt 3.2.3.) Stichproben ausgewählt und die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese nach Ethidiumbromid Färbung untersucht. Für die Fragmentanalyse wurden je 0,5 ml PCR-Produkt mit 10 ml deionisiertem Formamide (HiDi) und 0,5 ml Längenstandard (Size Standard Gene Scan-350 TAMRA) gemischt und in einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde in dem Sequenzierer eingelegt und es erfolgten der Lauf und die Analyse in dem für das Gerät vorgesehenen Polymer (POP-6 Polymer 3130). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des GeneMapper Software mit dem Analyse-Protokoll für die Mikrosatellitenanalyse (Mikrosatellite Default).

3.3. Statistische Auswertung

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Populationsstudie, die den möglichen Zusammenhang zwischen einem Krankheitsbild und dem Auftreten bestimmter Faktoren, hier bestimmter Polymorphismen, untersucht. Man vergleicht dazu eine Patientengruppe mit einer Kontrollgruppe aus gesunden, unverwandten Individuen und berechnet die Signifikanz der ermittelten Assoziationsstärke. Die Allel-,

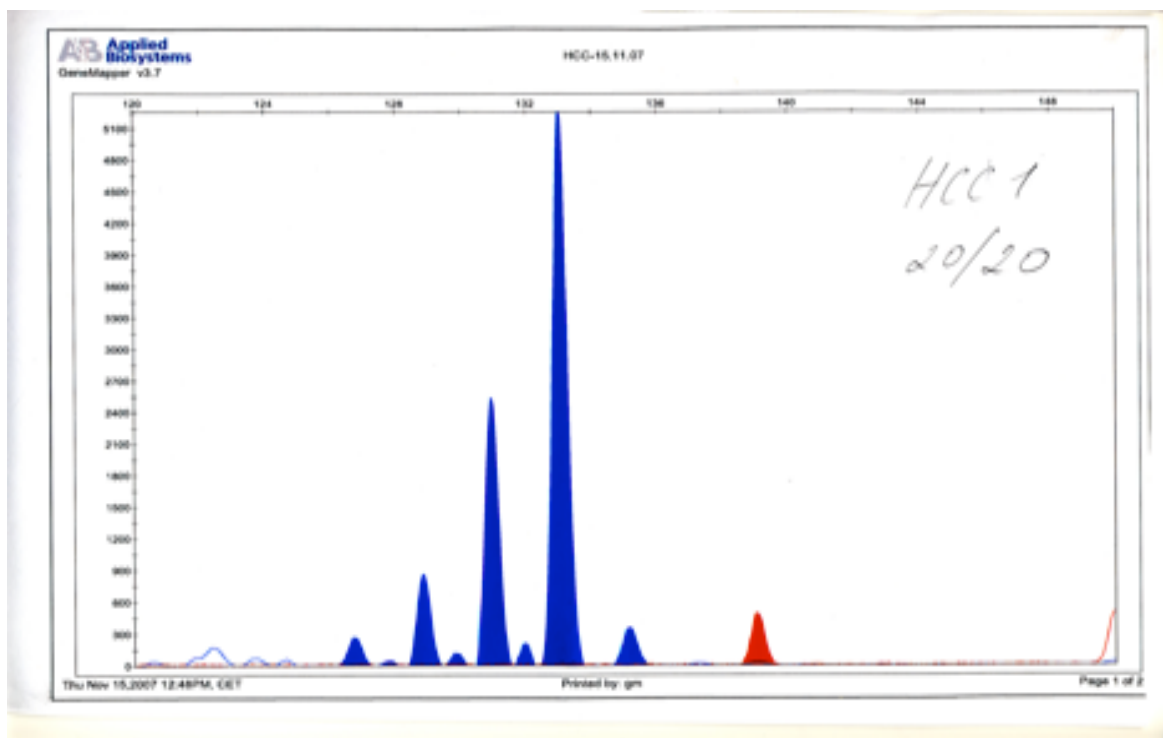
Genotyp- und Haplotypfrequenzen in der jeweiligen Patientengruppe und der Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat (χ^2)-Tests verglichen. Für Fallzahlen unter fünf wurde Fisher's Exact Test verwendet. Für multiple Vergleiche wurden die Signifikanzwerte nach Bonferroni korrigiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des SPSS-Programms Version 14.0.

4. Ergebnisse

4.1. Die Goldstandards für die Mikrosatellitenanalyse

Der Nachweis der *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismen im SSTR₁ und SSTR₂ erfolgte mit Hilfe einer PCR mit anschließender Fragmentlängenanalyse. Ausschlaggebend für die richtige Zuordnung der Allele war bei diesem Verfahren die Etablierung von sog. „Goldstandards“, d.h. von DNA-Proben bei denen der Anzahl an *CA-repeats* bekannt war. Für die Etablierung von Standards wurden Proben mit einem „homozygoten Laufmuster“ in der Fragmentanalyse ausgewählt. Bei diesen Proben wurde der Anzahl an *CA-Repeats* mittels Sequenzierung bestätigt (Abb.11). Die entsprechenden DNA-Proben wurden folglich bei jedem PCR-Lauf als Standards mitgeführt.

a)



Tab. 8. Genotypen für die *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismen im SSTR₂ und SSTR₁ in „gemachte“ DNA-Proben aus Tumor und nicht-Tumor-Gewebe.

Probennr.	Genotyp (CA)n repeat in SSTR ₂		Genotyp (CA)n repeat in SSTR ₁	
	Non-Tu-Gewebe	Tu-Gewebe	Non-Tu-Gewebe	Tu-Gewebe
R135	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₆ / (CA) ₁₈	(CA) ₁₆ / (CA) ₁₈
R164	(CA) ₂₀ / (CA) ₂₀	(CA) ₂₀ / (CA) ₂₀	(CA) ₁₉ / (CA) ₂₄	(CA) ₁₉ / (CA) ₂₄
R198	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₅ / (CA) ₁₈	(CA) ₁₅ / (CA) ₁₈
R327	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₆ / (CA) ₂₃	(CA) ₁₆ / (CA) ₂₃
R427	(CA) ₂₁ / (CA) ₂₂	(CA) ₂₁ / (CA) ₂₂	(CA) ₁₈ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₈ / (CA) ₁₉
R544	(CA) ₁₉ / (CA) ₂₁	(CA) ₁₉ / (CA) ₂₁	(CA) ₁₅ / (CA) ₁₆	(CA) ₁₅ / (CA) ₁₆
R546	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₉ / (CA) ₁₉	(CA) ₁₆ / (CA) ₁₇	(CA) ₁₆ / (CA) ₁₇
R572	(CA) ₂₁ / (CA) ₂₁	(CA) ₂₁ / (CA) ₂₁	(CA) ₁₆ / (CA) ₁₈	(CA) ₁₆ / (CA) ₁₈
R574	(CA) ₂₀ / (CA) ₂₀	(CA) ₂₀ / (CA) ₂₀	(CA) ₁₅ / (CA) ₁₅	(CA) ₁₅ / (CA) ₁₅

Auch während der Typisierung der restlichen DNA-Proben sind keine Hinweise auf eine Mikrosatelliteninstabilität erhoben worden.

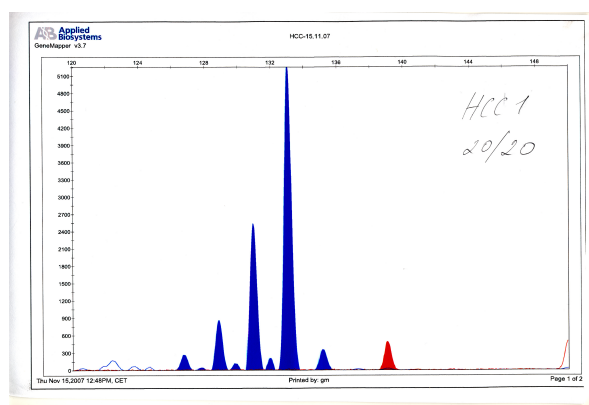
4.3. Verteilung des *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismus im Intron 1 des SSTR₂-Gens bei Kontrollpersonen und Patienten mit HCC

Der *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismus im *Intron 1* des SSTR₂-Gens wurde untersucht in:

- **N=93 Patienten mit HCC** (hier wurde als Material DNA aus im Paraffin eingebettetem HCC- oder nicht-HCC-Lebergewebe verwendet) und
- **N=157 Kontrollpersonen** (hier diente als Material buffy-coat DNA)

In der Abb.12 sind beispielhaft Pherogramme für eine für den Polymorphismus homozygote bzw. heterozygote Probe dargestellt.

Homozygot 20/20



Heterozygot 19/22

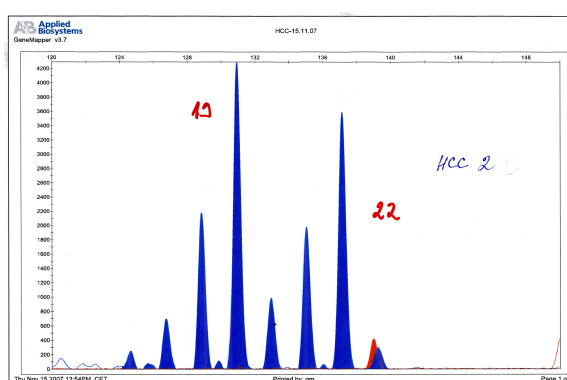


Abb. 12. Nachweis des *CA*-dinucleotid-tandem repeat Polymorphismus im $SSTR_2$ mittels Fragmentanalyse: beispielhafte Pherogramme für eine homozygote ($SSTR_2(CA)19/(CA)22$) bzw. eine heterozygote ($SSTR_2(CA)20/(CA)20$) Probe.

Die Allelhäufigkeiten für den *CA*-dinucleotid-tandem repeat Polymorphismus im $SSTR_2$ beim HCC und in der Kontrollpopulation sind in der Tabelle 9 angegeben.

Tab. 9. Die Allelhäufigkeiten für den *CA*-dinucleotid-tandem repeat Polymorphismus im $SSTR_2$ bei Patienten mit HCC und in der Kontrollpopulation

$SSTR_2 (CA)_n$ -tandem-repeat	Kontrollen N (%)	HCC N (%)
$(CA)17$	16(5,1%)	4(2,2%)
$(CA)18$	5(1,6%)	3(1,6%)
$(CA)19$	132(42,0%)	65(35,1%)
$(CA)20$	84(26,8%)	55(29,7%)
$(CA)21$	39(12,4%)	25 (13,5%)
$(CA)22$	31(9,9%)	24(13,0%)
$(CA)23$	6(1,9%)	9(4,9%)
$(CA)24$	1(0,3%)	0(0%)

Der Anzahl an *CA*-dinukleotid repeats lag zwischen 17 und 24 ($(CA)_{17-24}$), wobei die häufigsten Allele die mit 19 und 20 *CA*-dinukleotid repeats waren ($(CA)_{19}$ und $(CA)_{20}$). (s. Abb.13).

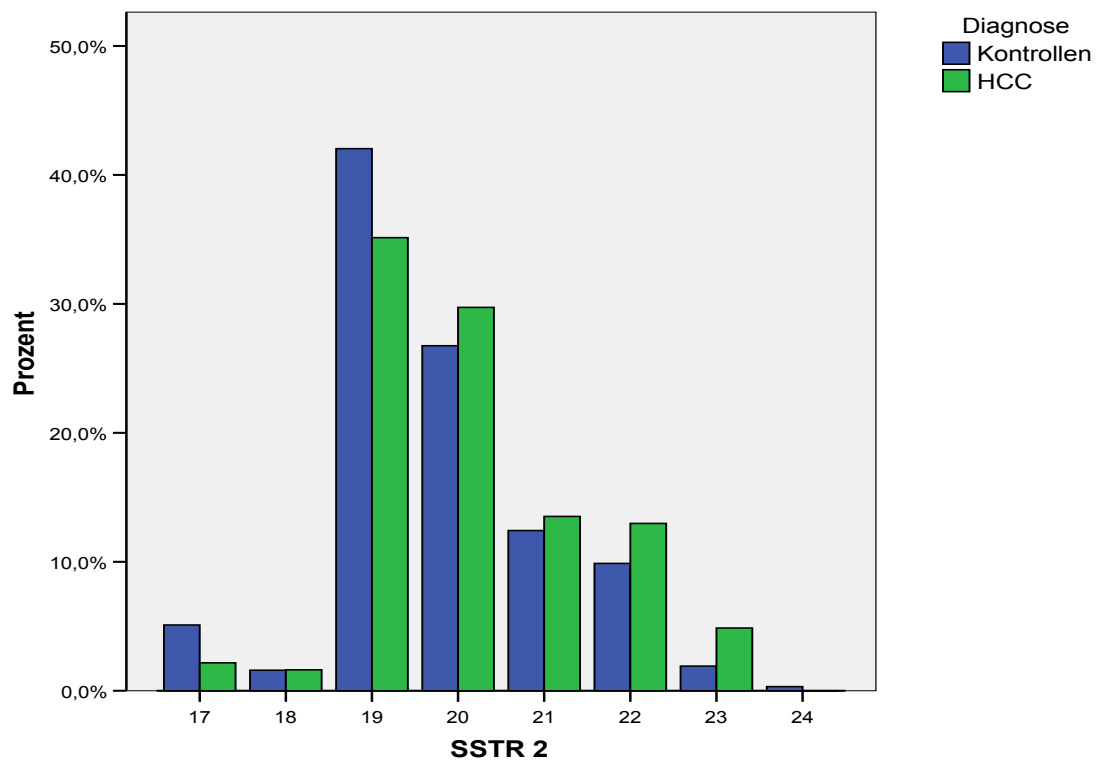


Abb.13. Die Allelhäufigkeiten (%) für den *CA-dinukleotid-tandem repeat* Polymorphismus im SSTR₂ bei dem HCC (N=93 Patienten) und bei den Kontrollpersonen (N=157).

Wenn die *CA-dinukleotid repeats* in „lange“ ($CA > 19$) und „kurze“ ($CA \leq 19$) *repeats* unterteilt werden, fällt es auf, dass die Häufigkeit von *CA-dinukleotid repeats* über 19 ($(CA)_{>19}$) bei Patienten mit HCC höher als in der Kontrollpopulation (61,1 % vs. 51,3%) liegt. Dieser Unterschied war auch statistisch signifikant (Tab. 10).

Tab. 10. Die Häufigkeit von „lange“ ($CA > 19$) sowie „kurze“ ($CA \leq 19$) – *repeats* im SSTR₂ bei Patienten mit HCC und in der Kontrollpopulation. (angegeben sind auch OR, 95% CI und p-Wert vs. Kontrollen)

SSTR ₂ - Mikrosatellitenpolymorphismus	Kontrollen N (%)	HCC N (%), p vs. Kontrollen
≤ 19 CA-Repeats	153 (48,7 %)	72 (38,9 %)
> 19 CA-Repeats	161 (51,3 %)	113 (61,1 %) (OR: 1,49, 95 CI (1,01-2,19), p=0,04).

Nach Unterteilung der *CA-repeats* im Intron 2 des *SSTR₂*-Gens in „lange“ (*CA*>19) sowie „kurze“ (*CA*≤19) – *repeats* wurde auch die Genotyp-Verteilung bzgl. den *SSTR₂* Mikrosatellitenpolymorphismus untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 angegeben.

Tab. 11. Genotyphäufigkeit für den *CA-dinukleotid tandem repeat* Polymorphismus im *SSTR₂* nach Unterteilung im „lange“ (*CA*>19) sowie „kurze“ (*CA*≤19) – *CA-repeats*.
(angegeben sind auch OR, 95% CI und p-Wert vs. Kontrollen)

SSTR₂-Genotyp	Kontrollen N (%)	HCC-Patienten N (%), p vs. Kontrollen
Homozygot „kurz“ (<i>CA</i> ≤19/ <i>CA</i> ≤19)	40(25,5%)	18(19,6%)
Heterozygot (<i>CA</i> ≤19/ <i>CA</i> >19)	73(46,5%)	36(39,1%)
Homozygot „lang“ (<i>CA</i> >19/ <i>CA</i> >19)	44(28%)	38(41,3%) (OR: 1,81; 95CI (1,01-3,22) p=0,04; Pc=n.9.)

Wie der Tabelle 11 entnommen werden kann, war die Häufigkeit von Trägern zweier „langer“ (*CA*>19) Allele in der Gruppe der Patienten mit HCC höher als in der Kontrollpopulation (41,3% vs. 28%). Dieser Unterschied war jedoch nach Korrektur für Mehrfachtestung statistisch nicht mehr signifikant.

4.4. Verteilung des *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismus im *SSTR₁* bei Patienten mit HCC und bei Kontrollpersonen

Der *CA-dinucleotid-tandem repeat* Polymorphismus im *SSTR₁* wurde untersucht in:

- **N=82 Patienten mit HCC** und
- **N=113 Kontrollpersonen**

Die Allelhäufigkeiten bei Patienten mit HCC und bei Kontrollpersonen sind in der Abbildung 14 angegeben.

Tab. 12. Allelhäufigkeiten für den *CA-dinukleotid-tandem repeat* Polymorphismus im SSTR₁ bei Patienten mit HCC und in der Kontrollpopulation.

SSTR₁ Mikrosatellitenpolymorphismus	Kontrollen N (%)	HCC N (%)
<i>(CA)</i> 13	0(0,0%)	1(0,06%)
<i>(CA)</i> 14	0(0,0%)	2(1,2%)
<i>(CA)</i> 15	84(37,2%)	57(34,8%)
<i>(CA)</i> 16	46(20,4%)	29(17,7%)
<i>(CA)</i> 17	7(3,1%)	6(3,7%)
<i>(CA)</i> 18	56(24,8%)	36(22,0%)
<i>(CA)</i> 19	5(2,2%)	6(3,7%)
<i>(CA)</i> 20	1(0,4%)	0(0%)
<i>(CA)</i> 21	6(2,7%)	7(4,3%)
<i>(CA)</i> 22	1(0,4%)	0(0,0%)
<i>(CA)</i> 23	9(4,0%)	8(4,9%)
<i>(CA)</i> 24	8(3,5%)	12(7,3%)
<i>(CA)</i> 25	2(0,9%)	0(0,0%)
<i>(CA)</i> 32	1(0,4%)	0(0,0%)

Der Anzahl an *CA-dinukleotid repeats* lag zwischen 13 und 32 (*(CA)*13-32), wobei die häufigsten Allele die mit 15, 16 und 18 *CA-dinukleotid repeats* waren (*(CA)*15,16,18).

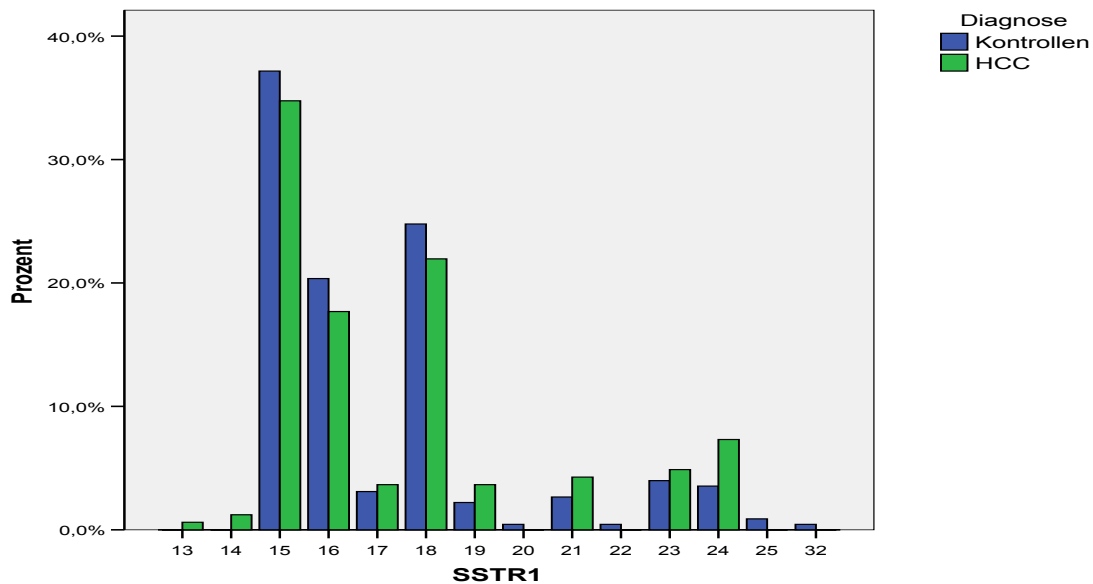


Abb.14. Die Allelhäufigkeiten (%) für den *CA-dinukleotid-tandem repeat* Polymorphismus im SSTR₁ bei Patienten mit HCC (N=82 Patienten) und bei Kontrollpersonen (N=113).

Nach Unterteilung der *CA-dinukleotid repeats* in „lange“ ($CA > 18$) und „kurze“ ($CA \leq 18$) repeats, ist aufgefallen, dass die Häufigkeit von *CA-repeats* ≥ 18 ($CA > 18$) bei Patienten mit HCC höher war als in der Kontrollpopulation (20,1 % vs. 14,4 %), dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (s.Tab.13).

Tab.13. Häufigkeit von „langen“ ($CA > 18$) sowie „kurzen“ ($CA \leq 18$) repeats im SSTR₁ in der Studienpopulation (p=n.s.).

SSTR₁-CA-dinukleotid-tandem repeat	Kontrollen N (%)	HCC N (%)
≤ 18 CA-Repeats	196 (80,6 %)	131 (79,9 %)
> 18 CA-Repeats	33 (14,4 %)	33 (20,1 %)

Bei dem Vergleich der Genotypenverteilung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit HCC und Kontrollpersonen (s.Tab 14).

Tab.14. Genotyphäufigkeiten für den *CA-dinukleotid tandem repeat* Polymorphismus in SSTR₁ nach Unterteilung in „länge“ (CA>18) sowie „kurze“ (CA≤18) *CA-repeats* (p=n.s.).

<i>SSTR1</i>-Genotyp	Kontrollen	HCC-Patienten
Homozygot „kurz“ (CA≤18/ CA≤18)	83(73,5%)	55(67,1%)
Homozygot (CA≤18/ CA>18)	27(23,9%)	21(25,6%)
Homozygot „lang“ (CA>18/CA>18)	3(2,7%)	6(7,3%)

5. Diskussion

5.1. Studiendesign und Methoden

5.1.1. Studiendesign - genetische Assoziationsstudie

Die hier vorgestellte Arbeit ist eine Assoziationsstudie. Assoziationsstudien stellen einen Ansatz zur Suche nach krankheitsrelevanten Genen dar.

Somatostatinrezeptoren werden in vielen Tumor-Entitäten exprimiert, so auch im HCC. Es gibt mehrere Fallberichte, welche über einen Benefit einer Behandlung mit Somatostatinanaloga bei einzelnen Patienten mit HCC berichten. Da Somatostatinanaloga ihre Wirkung über die Somatostatinrezeptoren ausüben, stellen die Gene für die Somatostatinrezeptoren SSTR₁ bis SSTR₅, vor allem jedoch SSTR₂, wichtige Kandidatengene für die Suszeptibilität für eine Therapie mit Somatostatinanaloga beim HCC dar. In den Genen für die Somatostatinrezeptoren wurden verschiedene Polymorphismen beschrieben, einschliesslich zwei *(CA)_n dinukleotid-tandem-repeat* Polymorphismen im SSTR₂ und SSTR₁. Für solche Mikrosatellitenpolymorphismen wurden oft funktionelle Auswirkungen, wie beispielsweise ein Einfluss auf die Genexpression, beschrieben.

5.1.2. Studienmaterial: Ausschluß einer Mikrosatelliteninstabilität

Spricht man über Mikrosatelliteninstabilität (MSI), dann ist die Mikrosatellitenzahl unterschiedlich (hier finden sich Veränderungen in der Länge einfacher repetetiver DNA-Elemente der Mikrosatelliten) in verschiedenen Zellen in einem Organismus, z.B. in Tumor und nicht-Tumorgewebezellen. Mikrosatelliten (MS) werden durch „*mismatch repair*“ (MMR) mittel MMR-Proteinkomplex korrigiert (200, 201). Wenn die MMR-Gene durch Mutationen betroffen sind, wird die MMR-Proteinkomplexfunktion beeinflusst und dadurch kommt es zur MSI (202, 203). Bezüglich MSI beim HCC ist die Studienlage widersprüchlich. Insgesamt sprechen jedoch die Studien dafür, dass HCC ein „*low*“ MSI Tumor ist (204).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Ausgangsmaterial für die DNA-Gewinnung sowohl Tumor-Gewebe als auch nicht Tumormaterial (Leukozyten) verwendet. Um die

Ergebnisse der Typisierungen dennoch miteinander vergleichen zu können, muss sichergestellt werden, dass in den beiden untersuchten Loci keine Mikrosatelliteninstabilität vorkommt. Für den Ausschluss einer Mikrosatelliteninstabilität in den beiden $(GT)_n$ -repeats-Loci in SSTR₁ und SSTR₂ wurden DNA-Proben aus eingefrorenem HCC-Gewebe bzw. tumorfreiem Lebergewebe typisiert. Bei alle 9 untersuchten Proben wurde derselbe Genotyp bzgl. den *CA-dinukleotid-tandem-repeat* Polymorphismen in SSTR₂ und SSTR₁ nachgewiesen, so dass sich kein Hinweis auf eine Mikrosatelliteninstabilität ergab. Auch bei der Typisierung aller restlichen DNA-Proben aus dem Tumorgewebe ergaben sich keine Hinweise auf eine Mikrosatelliteninstabilität (kein spezifisches Laufmuster).

5.1.3. Validität der Genotypisierungsmethoden

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung einer Assoziationsstudie ist die sichere Identifizierung und Zuordnung sämtlicher bereits bekannter Allele des zu untersuchenden Polymorphismus. Für die Typisierung der *SSTR-dinukleotid-repeat* Polymorphismen wurde eine Längenpolymorphismus-Analyse auf einem automatischen Sequenzierer durchgeführt. Hierbei ist es am wichtigsten die richtige Ermittlung der Fragmentlänge bzw. der Anzahl der *CA-repeats* zu gewährleisten. Daher wurden zunächst für die Analyse so genannte „Goldstandards“ hergestellt. Es handelt sich hier um Proben mit einem für einen homozygoten Genotyp entsprechenden Laufmuster unterschiedlicher Länge, bei welcher die Ermittlung der Anzahl an *CA-dinukleotid repeats* mittels Sequenzierung vorgenommen wurde. Diese beide Proben wurden bei jedem Lauf mituntersucht, für die Ermittlung des Genotyps für jede einzelne Probe erfolgte ein Vergleich des Laufmusters der Elektropherogramme mit dem der beiden Standards. Somit kann hier von einer korrekten Genotypisierung ausgegangen werden. Ein weiterer Beleg dafür, dass die Polymorphismen korrekt typisiert worden sind, ist die Vergleichbarkeit der Frequenzen der einzelnen Polymorphismen in der Kontrollpopulation mit den Frequenzen in anderer Populationen mit einer ähnlichen ethnischen Herkunft (s. Punkt 5.2.1).

5.2. Verteilung der Polymorphismen in der Studienpopulation

5.2.1. Verteilung der Polymorphismen in der Kontrollpopulation im Vergleich zu Daten aus der Literatur

Die beiden *(CA)_n-dinukleotid-repeat*-Polymorphismen im SSTR₁ und SSTR₂ wurden bisher in einer weiteren Studie in Populationen kaukasischer Herkunft untersucht (198). Der repeat-Polymorphismus im SSTR₂ wurde auch in einer weiteren Arbeit untersucht (197), hier sind jedoch die Allelhäufigkeiten nicht angegeben, daher ist ein Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich.

In der Arbeit [198] wurden zwei Fallassoziationsstudien durchgeführt in der die Verteilung der Polymorphismen in einer Gruppe von 109 Brustkrebspatienten und 109 Kontrollpersonen, sowie in einer zweiten Gruppe von 150 Patienten mit aktinischer Keratose und 150 Kontrollpersonen untersucht wurde. Die Allelhäufigkeiten für die *(CA)_n-repeat*-Polymorphismen im SSTR₁ und SSTR₂ in den beiden untersuchten Kontrollpopulationen und in unseren eigenen Kontrollpopulation sind in der Abbildungen 15 und 16 schematisch dargestellt.

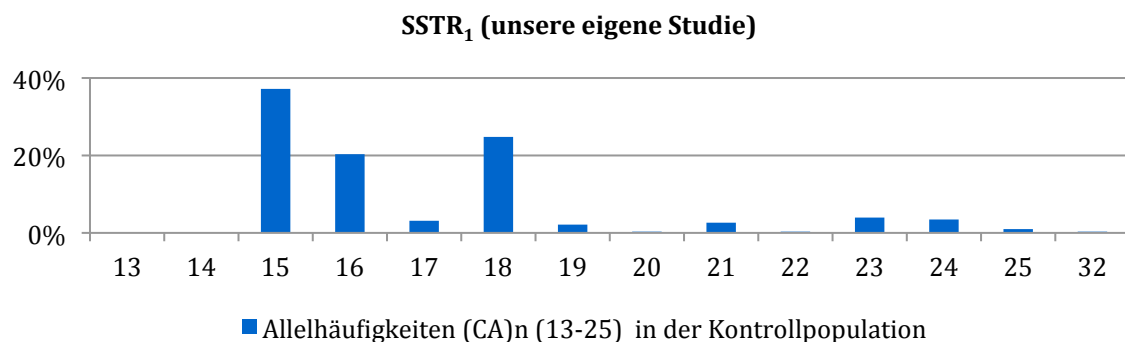
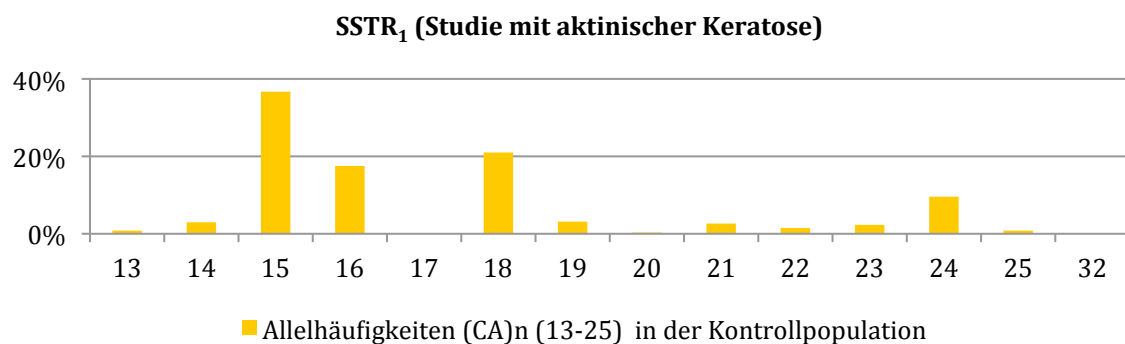
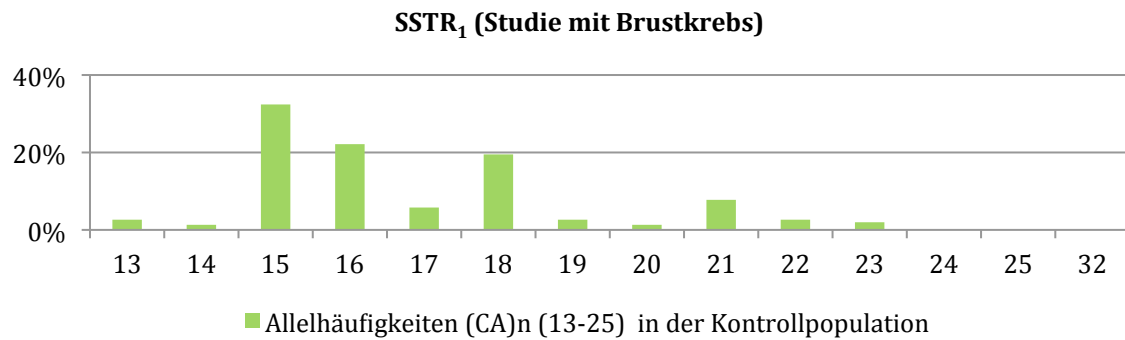


Abb.15. Die Allelhäufigkeiten (in %) für den *CA-dinukleotid-tandem repeat (CA)_n* Polymorphismus im SSTR₁ in den beiden Kontrollpopulationen der publizierten Untersuchung von Carless et al. (198) bei der Studie mit Brustkrebs (N=109) und bei der Studie mit aktinischer Keratose (N=150) sowie in unsere eigene Kontrollpopulation (N=113).

Wie den beiden Abbildungen 15 und 16 entnommen werden kann waren die Allelhäufigkeiten für die *CA-dinukleotid-tandem repeat (CA)_n* Polymorphismen im SSTR₁ und SSTR₂ in unserer Kontrollpopulation vergleichbar mit den Allelhäufigkeiten in den beiden voruntersuchten Populationen aus der Literatur (198). Dies spricht auch für die Validität der Genotypisierungsmethoden.

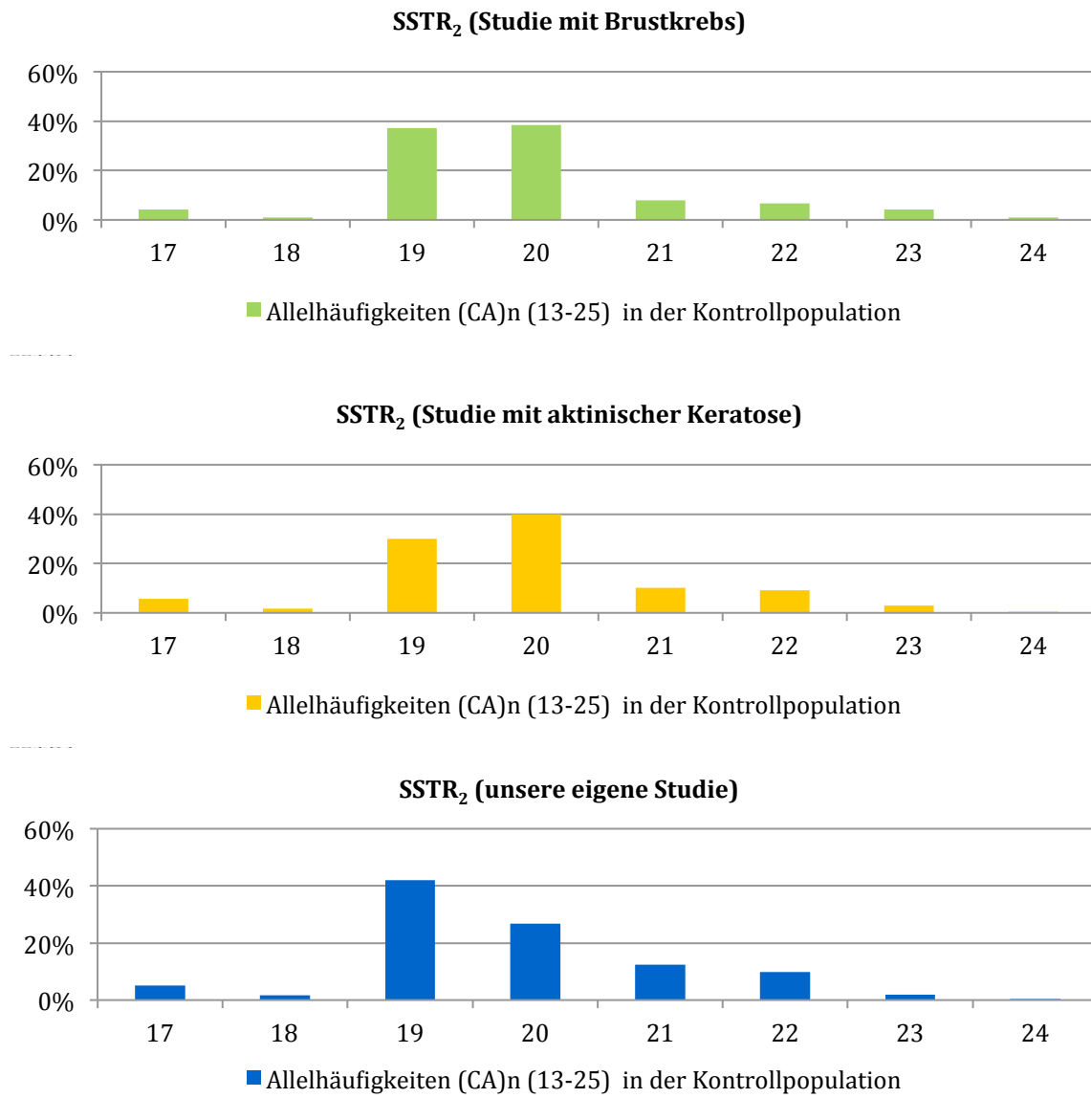


Abb.16. Die Allelhäufigkeiten (in%) für den *CA-dinukleotid-tandem repeat (CA)_n* Polymorphismus im SSTR₂ in den beiden Kontrollpopulationen der publizierten Untersuchung von Carless et al. (198) bei der Studie mit Brustkrebs (N=109) und bei der Studie mit aktinischer Keratose (N=150) sowie in unserer eigenen Kontrollpopulation (N=157).

5.2.2. Die SSTR₁ und SSTR₂ - Mikrosatellitenpolymorphismen beim HCC

Von allen Tumorentitäten, die Somatositatinrezeptoren exprimieren, wurde bisher in zwei unabhängigen Studien nur der Brustkrebs auf eine mögliche Assoziation mit dem *(CA)_n – dinukleotide-repeat* Polymorphismus im SSTR₂ untersucht. Während eine der Studie eine protektive Rolle des Genotyps mit 21 *CA-repeats*, *CA₍₂₁₎/CA₍₂₁₎* zeigte (197),

konnte in der zweiten Studie keine Assoziation des Polymorphismus mit dem Brustkrebs festgestellt werden (198).

Bisher gibt es in der Literatur keine Berichte über die Häufigkeit des Mikrosatellitenpolymorphismus im SSTR₂ beim HCC. In der hier vorgelegten Arbeit wurde zum ersten Mal eine signifikante Assoziation des Polymorphismus im Intron 1 des SSTR₂-Gens mit dem Hepatozellulären Karzinom nachweisen. In Patienten mit HCC lag die Häufigkeit von *CA-dinukleotid repeats* über 19 ($(CA)_{>19}$) etwas höher als in der Kontrollpopulation (61,1 % vs. 38,9%, OR: 1,49, 95 CI (1,01-2,19), $p=0,04$, $pc=n.s.$)).

Der *(CA)_n-dinukleotide repeat* Polymorphismus im SSTR₁ wurde bisher in einer einzigen Studie auf eine Assoziation mit dem Brustkrebs hin untersucht (198). Hier zeigte sich keine Assoziation des Polymorphismus mit der Suszeptibilität für den Brustkrebs. In unsere Arbeit wurde der Polymorphismus das erste Mal auf eine Assoziation mit dem HCC hin untersucht. Ähnlich wie für den Mikrosatellitenpolymorphismus im SSTR₂ lag die Häufigkeit von „langen“ *(CA)_n-repeats* ($n>18$) und bei Patienten mit HCC höher als in der Kontrollpopulation (20,1 % vs. 14,4 %), dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei der hier beschriebenen Assoziation des Mikrosatellitenpolymorphismus im SSTR₂ mit dem HCC handelt es sich um eine Erstbeschreibung. Um eine eindeutige Assoziation mit der Suszeptibilität für ein HCC herauszufinden, sollte diese Assoziation (wie alle genetischen Assoziationen) in weiteren, unabhängigen Populationen überprüft werden.

5.3. Bewertung den Ergebnisse aus funktioneller Sicht

Somatostatin ist ein zyklisches Tetradekapeptid, das ubiquitär im Organismus exprimiert wird. Es hat viele biologische Wirkungen einschließlich eines inhibitorischen Effekts auf sekretorische und proliferative Prozesse im Körper. Eine antiproliferative Wirkung von Somatostatin wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen, was für eine wichtige Rolle in der Entwicklung und in Wachstumsprozessen spricht (206,207). Die Wirkung von Somatostatin wird durch Bindung an spezifische Rezeptoren (SSTR₁₋₅) ausgeübt, wobei eine Expression dieser Rezeptoren in vielen Gewebsarten einschliesslich Tumorgewebe nachgewiesen wurde (206, 208).

Verschiedene Somatostatinanaloga wurden für den therapeutischen Einsatz entwickelt und werden heute in der Behandlung von verschiedenen Tumoren eingesetzt. Oktreotid, ein Somatostatinanalogon, welches seine Wirkung vor allem mittels Interaktion mit dem SSTR₂ ausübt, wurde auch in der Therapie des HCC eingesetzt. Während einige Studien über spektakuläre Ergebnisse (im Einzelfall) berichteten (166,167), zeigten andere Studien keinen positiven Effekt (168). Es ist möglich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien auf unterschiedliche Rezeptorexpressionsmuster, die wiederum möglicherweise durch Genpolymorphismen in das SSTR₂-Gen zustanden kommen, beruhen.

Die hier beschriebene Assoziation des *(CA)_n-dinukleotid repeat* Polymorphismus im SSTR₂ mit dem HCC spricht an sich für eine Rolle des Polymorphismus in der Entstehung des HCC. Ob der Polymorphismus die Expression von SSTR₂ im HCC beeinflusst, oder ob hier andere Mechanismen ins Spiel kommen, bleibt weiterhin zu untersuchen. Aus der Literatur ist es bekannt, dass repeat-Polymorphismen die Promotoraktivität der Gene und somit die Genexpression verändern können. Das erste Exon des SSTR₂-Gens ist nicht kodierend, so dass die ganze Region bis zum Translationss-Start häufig als Promotorsequenz bezeichnet wird (205). Der *(CA)_n-dinukleotid repeat* Polymorphismus befindet sich 4114 bp aufwärts des Translationsstartes, in der Promotorregion, welches auch regulatorische Elemente wie z.B. für die Antwort auf Estrogene beinhaltet (205). Somit ist eine funktionelle Wirkung des Mikrosatellitenpolymorphismus sehr gut möglich.

5.4. Ausblick

Um eine mögliche Rolle der untersuchten Mikrosatellitenpolymorphismen in der HCC-Suszeptibilität eindeutig zu klären, sollte die hier beschriebene Assoziation, wie bereits vorher erwähnt, in weiteren unabhängigen Patienten-Populationen mit HCC überprüft werden. Der SSTR₂-Mikrosatellitenpolymorphismus könnte in diesem Fall als Marker für eine Risikoassoziation fungieren. Interessant wäre es auch zu überprüfen ob ein Einfluss des Polymorphismus auf verschiedene Eigenschaften der Tumoren wie z. B. Metastasierung, Invasivität usw. sowie auf den Verlauf der Erkrankung besteht.

Von großem Interesse ist sicherlich die Untersuchung der Auswirkung des Polymorphismus auf die SSTR₂-Expression und vor allem auf die Antwort auf eine Therapie mit Somatostatinanaloga. Wenn hier ein Zusammenhang zu finden wäre, könnte dieser Polymorphismus nicht nur als Suszeptibilitätsmarker, sondern auch als prä-Therapeutischer Screening-Marker für eine Therapie mit Somatostatinanaloga bei Patienten mit HCC fungieren.

6. Zusammenfassung

Eine inhibitorische Wirkung von Somatostatin und dessen Analoga auf die Zellproliferation wurde in Tumorzelllinien mehrfach nachgewiesen. Eine verminderte Bindung von Somatostatin oder Somatostatinanaloga an den Somatostatinrezeptoren könnte sich negativ auf die Tumorsuppression auswirken. Es ist möglich, dass diese Bindung durch Polymorphismen in den Somatostatinrezeptoren beeinflusst wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von zwei $(CA)_n$ -dinucleotid-tandem repeat Polymorphismen in den Genen für die Somatostatinrezeptoren SSTR₁ und SSTR₂ in der Suszeptibilität für das hepatozelluläre Karzinom. Hierzu wurden die Mikrosatellitenpolymorphismen bei 93 Patienten mit HCC und 157 gesunde Blutspender untersucht. Bei dem Vergleich der Allelverteilung für den $(CA)_n$ -dinucleotid-tandem repeat Polymorphismus im SSTR₂ zeigte sich, dass die Häufigkeit von CA -dinukleotid-tandem repeats über 19 ($(CA)_{>19}$) in Patienten mit HCC signifikant höher liegt als in der Kontrollpopulation. Eine ähnliche Tendenz wurde auch für den $(CA)_n$ -dinucleotid-tandem repeat Polymorphismus im SSTR₁ beobachtet.

Die hier zum ersten Mal beschriebene Assoziation eines Polymorphismus im SSTR₂ mit dem HCC muss in weiteren unabhängigen Studien überprüft werden. *Per se* spricht diese Assoziation für eine mögliche pathogenetische Rolle des Polymorphismus in der Entstehung des HCCs. Ob die beschriebenen Polymorphismen die Expression der Somatostatinrezeptoren SSTR₁ und SSTR₂ oder die Bindungskapazität von Somatostatin und dessen Analoga an den Rezeptoren beeinflussen ist noch nicht bekannt. Dies sowie die Auswirkung der Polymorphismen auf die klinischen Charakteristika des HCC sollte in zukünftige Studien untersucht werden. Von großem Interesse bleibt auch die Untersuchung eines möglichen Einflusses der Polymorphismen auf das Ansprechen auf eine Therapie mit Somatostatinanaloga. Wenn hier ein Zusammenhang besteht, könnte die Typisierung der Polymorphismen ein mögliches prä-therapeutisches Screeningverfahren beim HCC darstellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127(suppl 1(5)):S5–S16
2. Parikh S, Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *Am J Med*. 2007;120(3):194–202
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(2), 74-108
4. Kensler TW, Qian GS, Chen JG, Groopman JD. Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(5): 321-329
5. Bosch FX, Ribes J, Borrás J: Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver. Dis* 1999; 19: 271–285
6. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol*. 2002;35(suppl 2(5)):S72–S78
7. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(27): 4300-8
8. Harrisons Innere Medizin, Band 1, Fauchi, Braunwald et al. 17. Auflage. 2008
9. Jang JW, Yoon SK, Bae SH, Choi JY, Chung KW, Sun HS. Rapidly progressing Budd-Chiari syndrome complicated by hepatocellular carcinoma. *Korean J Intern Med*. 2003 Sep;18(3):191-5
10. Vogt W. Value of ultrasound and doppler sonography in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Praxis (Bern 1994)*. 2005 Apr 20;94(16):639-43
11. Kinnard MF, Alavi A, Rubin RA, Lichtenstein GR. Nuclear imaging of solid hepatic masses. *Semin Roentgenol* 1995; 30: 375-395
12. Reske SN. Positronen-Emissions-Tomographie in der Onkologie. *Dt Ärztebl* 1998; 95: 1495–1497.
13. Suriapranata IM, Sudania WM, Tjong WY, Suciption AA, Gani RA, Hasan I, Sanityoso A, Budihusodo U, Miskad UA, Akil F, Lelosutan SA, Martamala R, Yusuf I, Lesmana LA, Sulaiman A, Tai S. Alpha-fetoprotein gene polymorphisms and risk of HCC and cirrhosis. *Clin Chim Acta*. 2010 Mar;411(5-6):351-8. Epub 2009 Dec 5.
14. Chen GG, Ho RL, Wong J, Lee KF, Lai PB. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of human alpha-fetoprotein (AFP) gene and its significance in hepatocellular carcinoma (HCC). *Eur J Surg Oncol*. 2007 Sep;33(7):882-6. Epub 2007 Apr 12.

15. Shao YY, Lin ZZ, Hsu C, Shen YC, Hsu CH, Cheng AL. Early alpha-fetoprotein response predicts treatment efficacy of antiangiogenic systemic therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2010 Oct 1;116(19):4590-6
16. Saffroy R, Pham P, Reffas M, Takka M, Lemoine A, Debuire B. New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med*, 2007. 45(9): 1169-79
17. Yao, D.F., Z.Z. Dong, and M. Yao. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007. 6(3): 241-7
18. Zhou, L., J. Liu, and F. Luo. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2006. 12(8): 1175-81
19. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, Piscaglia F, Gramantieri L, Zanetti M, Sherman M. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut*, 2001. 48(2): 251-9
20. Bruix, J. and M. Sherman. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2005. 42(5): 1208-36
21. Motola-Kuba D, Zamora-Valdés D, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol*. 2006;5(1):16-24
22. Kuper H, Ye W, Broome U et al. The risk of liver and bile duct cancer in patients with chronic viral hepatitis, alcoholism, or cirrhosis. *Hepatology* 2001;5
23. Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 1980. 286(5772): 533-535
24. Lupberger, J. and E. Hildt. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(1): 74-81
25. But, D.Y., C.L. Lai, and M.F. Yuen. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(11): 1652-1656
26. Levrero, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*, 2006. 25(27): 3834-3847
27. Friedman, S.L. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2004. 1(2): 98-105
28. Farazi, P.A. and R.A. DePinho. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(9): 674-687
29. Lee, J.S. and S.S. Thorgeirsson. Genetic profiling of human hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 2005. 25(2): 125-132

30. Stipa F, Yoon SS, Liau KH, Fong Y, Jarnagin WR, D'Angelica M, Abou-Alfa G, Blumgart LH, DeMatteo RP. Outcome of patients with fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2006. 106(6): 1331-8
31. Tischoff, I. and A. Tannapfel. Hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma--different prognosis, pathogenesis and therapy. *Zentralbl Chir*, 2007. 132(4): 300-5
32. Llovet, J.M. Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2004. 7(6): 431-441
33. Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, Manchini R. The tumor spectrum in *FHIT*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10250-10255
34. Roumen Balansky, Francesco D'Agostini, Gancho Ganchev, Alberto Izzotti, Barbara Di Marco, Ronald A. Lubet, Nicola Zanesi, Carlo M. Croce, and Silvio De Flora. Influence of *FHIT* on benzo[a]pyrene-induced tumors and alopecia in mice: Chemoprevention by budesonide and *N*-acetylcysteine. *PNAS* May 16, 2006 vol. 103 no. 20 7823-7828
35. Rong-Hua Xu, Liang-Yan Zheng, Dong-Lei He, Jian Tong, Li-Ping Zheng, Wu-Ping Zheng, Jin Meng, Li-Ping Xia, Cong-Jun Wang, and Ji-Lin Yi. Effect of fragile histidine triad gene transduction on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2008 June 21; 14(23): 3754-3758.
36. Fabbri M, Iliopoulos D, Trapasso F, Ageilan RI, Cimmino A, Zanesi N, et al. WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15611-15616
37. Lin J, Wang B, Huang AM, Wang XJ. The relationship between FHIT and WWOX expression and clinicopathological features in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2010 May;18(5):357-60
38. Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebersorger A, et al. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomerase. *EMBO J* 1997; 16: 3219-3232
39. Cardoso C, Timsit S, Villard L, Khrestchatisky M, Fontes M, Colleaux L. Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 679-684
40. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The Polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624-629
41. Kleer CG, Cai Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11606-11611

42. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22: 5323–5335
43. Sasaki M, Ikeda H, Itatsu K, Yamaguchi J, Sawada S, Minato H, Ohta T, Nakanuma Y. The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*. 2008 Aug;88(8):873-82. Epub 2008 Jun 30
44. Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, Yokosuka O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2009 Sep;40(9):1304-11. Epub 2009 Apr 22
45. Tonini T, D'Andrilli G, Fucito A, Gaspa L, Bagella L. Importance of Ezh2 polycomb protein in tumorigenesis process interfering with the pathway of growth suppressive key elements. *J Cell Physiol*. 2008 Feb;214(2):295-300
46. Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat. Genet.*, 14: 415-420, 1996.
47. Zhu Z, Zhu M, Ni C. Significance of p33(ING1b) and p53 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2002 Oct 10;82(19):1332-6
48. Zhu Z, Lin J, Qu JH, Feitelson MA, Ni CR, Li FM, Zhu MH. Inhibitory effect of tumor suppressor p33(ING1b) and its synergy with p53 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005 Apr 7;11(13):1903-9
49. Zhu Z, Luo Z, Li Y, Ni C, Li H, Zhu M. Human inhibitor of growth 1 inhibits hepatoma cell growth and influences p53 stability in a variant-dependent manner. *Hepatology*. 2009 Feb;49(2):504-12
50. Kataoka H, Bonnefin P, Vieyra D, Feng X, Hara Y, Miura Y, Joh T, Nakabayashi H, Vaziri H, Harris CC, Riabowol K. ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):5785-92
51. Anzola M, Burgos JJ. Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2003 Nov 19;5(28):1-16
52. Oyaagbemi AA, Azeez Ol, Saba AB. Hepatocellular carcinoma and the underlying mechanisms. *Afr Health Sci*. 2010 Mar;10(1):93-8
53. Caruso M. L., Valentini A. M. Overexpression of p53 in a large series of patients with hepatocellular carcinoma: a clinicopathological correlation. *Anticancer Res*, 19: 3853-3856, 1999
54. Edis C., Kahler C., Klotz W., Herold M., Feichtinger H., Konigsreiner A., Margreiter R., Jaschke W., Vogel W. A comparison between α -fetoprotein and p53 antibodies in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Transplant. Proc.*, 30: 780-781, 1998

55. Chen SX, Xu WD, Yin GW, Xi W, Chen J, Xu QY, Ma GJ. Clinical therapeutic effect and biological monitoring of p53 gene in advanced hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010 Aug 17;90(31):2182-6
56. Yu M, Chen W, Zhang J. p53 gene therapy for pulmonary metastasis tumor from hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs*. 2010 Oct;21(9):882-4
57. Yuan RH, Jeng YM, Chen HL, Lai PL, Pan HW, Hsieh FJ, Lin CY, Lee PH, Hsu HC. Stathmin overexpression cooperates with p53 mutation and osteopontin overexpression, and is associated with tumour progression, early recurrence, and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol*. 2006 Aug;209(4):549-58
58. Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PH, Sheu JC, Chen CL, Hsu HC. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2003 Jul 1;98(1):119-27.
59. Imaizumi T, Higaki Y, Hara M, Sakamoto T, Horita M, Mizuta T, Eguchi Y, Yasutake T, Ozaki I, Yamamoto K, Onohara S, Kawazoe S, Shigematsu H, Koizumi S, Kudo S, Tanaka K. Interaction between cytochrome P450 1A2 genetic polymorphism and cigarette smoking on the risk of hepatocellular carcinoma in a Japanese population. *Carcinogenesis*. 2009 Oct;30(10):1729-34. Epub 2009 Jul 30.
60. Sheng Y, Huang TR, Zhang ZQ, Deng W, Yu JH, Zhang CY, Zhou DN, Li JL, Ye SY, Liang RX, Wei ZL. Study on the relationship between familial clustering of hepatocellular carcinoma and polymorphism of cytochrome P450 2E1 gene in Zhuang population, Guangxi. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2009 Feb;30(2):151-5.
61. Yu MW, Chiu YH, Yang SY, Santella RM, Chern HD, Liaw YF, Chen CJ. Cytochrome P450 1A1 genetic polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers. *Br J Cancer*. 1999 May;80(3-4):598-603.
62. Li R, Shugart YY, Zhou W, An Y, Yang Y, Zhou Y, Zhang B, Lu D, Wang H, Qian J, Jin L. Common genetic variations of the cytochrome P450 1A1 gene and risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Eur J Cancer*. 2009 May;45(7):1239-47. Epub 2008 Dec 26.
63. Silvestri L, Sonzogni L, De Silvestri A, Gritti C, Foti L, Zavaglia C, Leverì M, Cividini A, Mondelli MU, Civardi E, Silini EM. CYP enzyme polymorphisms and susceptibility to HCV-related chronic liver disease and liver cancer. *Int J Cancer*. 2003 Apr10;104(3):310-7
64. Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Yoshida H, Taniguchi H, Goto T, Moriyama M, Otsuka M, Shiina S, Shiratori Y, Ito Y, Omata M. Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2003 Jan;37(1):65-71
65. Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Shiina S, Kawabe T, Ito YM, Omata M. UDP-glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are

associated with hepatocellular carcinoma in japanese patients with hepatitis C virus infection. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2441-6

66. Stücker I, Lorient MA, N'koutchou G, Cénée S, Bodin L, Mulot C, Gelu-Simeon M, Pelletier L, Bronowicki JP, Degos F, Beaune P, Laurent-Puig P, Hémon D, Trinchet JC, Pelletier G. UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 genetic polymorphisms in hepatocellular carcinoma: a differential impact according to seropositivity of HBV or HCV markers? *BMC Cancer.* 2007 Nov 19;7:214

67. Tseng CS, Tang KS, Lo HW, Ker CG, Teng HC, Huang CS. UDP-glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma risk and onset age. *Am J Gastroenterol.* 2005 Aug;100(8):1758-63

68. Kong SY, Ki CS, Yoo BC, Kim JW. UGT1A7 haplotype is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Cancer Sci.* 2008 Feb;99(2):340-4

69. Jin F, Xiong WJ, Jing JC, Feng Z, Qu LS, Shen XZ. Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Jul;137(7):1095-104. Epub 2011 Jan 15.

70. Wang B, Huang G, Wang D, Li A, Xu Z, Dong R, Zhang D, Zhou W. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *J Hepatol.* 2010 Sep;53(3):508-18. Epub 2010 Jun 1.

71. Clifford RJ, Zhang J, Meerzaman DM, Lyu MS, Hu Y, Cultraro CM, Finney RP, Kelley JM, Efroni S, Greenblum SI, Nguyen CV, Rowe WL, Sharma S, Wu G, Yan C, Zhang H, Chung YH, Kim JA, Park NH, Song IH. Genetic variations at loci involved in the immune response are risk factors for hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2010 Dec;52(6):2034-43.

72. Nakajima Y, Ko S, Kanamura T, Nagao M, Kanehiro H, Hisanaga M, Aomatsu Y, Ikeda N, Nakano H. Repeat liver resection for hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 339–344

73. Nicoli N, Casaril A, Marchiori L, Mangiante G, Hasheminia AR. Treatment of recurrent hepatocellular carcinoma by radiofrequency thermal ablation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 417–421

74. Yao FY, Xiao L, Bass NM, Kerlan R, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging. *Am J Transplant*, 2007. 7(11): 2587-96

75. Spangenberg HC, Mohr L, Blum HE. Regional therapy of liver tumors. *Internist (Berl)*, 2007, 48: 40–45

76. Helmberger, Th.K., Radiofrequency Ablation: 8 In: Percutaneous Tumor Ablation in Medical Radiology, Springer Verlag (2008)

77. Rhim H, Lim HK. Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma: Pros and Cons. *Gut Liver.* 2010 Sep;4(Suppl. 1):S113-S118. Epub 2010 Sep 10

78. Lencioni R, Cioni D, Crocetti L, Bartolozzi C. Percutaneous ablation of hepatocellular carcinoma: state-of-the-art. *Liver Transpl.* 2004;10(2 Suppl 1):S91–S97
79. Kwon JH. Is Percutaneous Ethanol Injection Therapy Still Effective for Hepatocellular Carcinoma in the Era of Radiofrequency Ablation? *Gut Liver.* 2010 Sep;4(Suppl. 1):S105-S112. Epub 2010 Sep 10
80. Poon RT, Fan ST, Tsang FH. Locoregional therapies for hepatocellular carcinoma: a critical review from the surgeon's perspective. *Ann Surg.* 2002;235:466–486
81. Jansen MC, van Hillegersberg R, Chamuleau RA, van Delden OM, Gouma DJ, van Gulik TM. Outcome of regional and local ablative therapies for hepatocellular carcinoma: a collective review. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31:331–347
82. Garrean S, Hering J, Helton WS, Espat NJ. A primer on transarterial, chemical, and thermal ablative therapies for hepatic tumors. *Am J Surg.* 2007;194:79–88
83. Kuang M, Lu MD, Xie XY, et al. Ethanol ablation of hepatocellular carcinoma Up to 5.0 cm by using a multipronged injection needle with high-dose strategy. *Radiology.* 2009;253:552–561
84. Ho CS, Kachura JR, Gallinger S, et al. Percutaneous ethanol injection of unresectable medium-to-large-sized hepatomas using a multipronged needle: efficacy and safety. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2007;30:241–247
85. Shibata T, Maetani Y, Ametani F, Itoh K, Konishi J. Percutaneous ethanol injection for treatment of adrenal metastasis from hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol.* 2000;174:333–335
86. Zuo CJ, Wang PJ, Shao CW, et al. CT-guided percutaneous ethanol injection with disposable curved needle for treatment of malignant liver neoplasms and their metastases in retroperitoneal lymph nodes. *World J Gastroenterol.* 2004;10:58–61
87. Kuhlicke, I., Perkutane Radiofrequenzablation der Leber: Vergleich vier verschiedener Radiofrequenzsysteme in einer tierexperimentellen Studie mit und ohne Modulation der physiologischen Leberperfusion: 7-9 In: *Dissertation (2006), Eberhardt Karls Universität Tübingen*
88. Callstrom, M.R. and J.W. Charboneau. Technologies for ablation of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2008. 134(7): 1831-5
89. Müller, H., Locoregional Chemotherapy including Perfusion: 33 In: *Percutaneous Tumor Ablation in Medical Radiology, Springer Verlag (2008)*
90. Zangos, S., Eichler, K., Mack, G.M., Vogl, Th.J., Transarterial Chemoembolization (TACE) and Combined Therapies, 112 In: *Percutaneous Tumor Ablation in Medical Radiology, Springer Verlag (2008)*

91. Lambert B, Van Vlierberghe H, Troisi R, Defreyne L. Radionuclide therapy for hepatocellular carcinoma. *Acta Gastroenterol Belg.* 2010 Oct-Dec;73(4):484-8.
92. Arndt WeinMann, MarCuS a. WörnS, Peter r. galle, Mainz. Sorafenib bei fortgeschrittenem HCC. *Hepatitis&more* 1/2009.
93. Llovet, J.M., et al., Sorafenib in advanced hepatozellulaler carcinoma. *N Engl J Med*, 2008. 359(4): p. 378-90
94. Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, Tan PH, Soo KC, Tran E. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol.* 2003;3:19
95. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:7099-109
96. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359:378-390
97. Cheng A, Kang Y, Chen Z, Tsao C, Qin S, Kim J, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan ZZ. Randomized phase III trial of sorafenib versus placebo in Asian patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:4509.
98. Cheng AL, Kong YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim J, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:25-34
99. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgaard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359:378-90
100. Faivre S, Demeri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:734-45
101. Raoul JL, Finn R, Kang YK, Park JW, Harris R, Coric V, et al. An open-label phase II study of first- and second-line treatment with brivanib in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009;27
102. Kanai F, Yoshida H, Teratani T, Sato S, Tateishi R, Obi S, et al. New feasibility study design with hepatocellular carcinoma: A phase I/II study of TSU-68, an oral angiogenesis inhibitor. *J Clin Oncol.* 2006;24
103. Toh H, Chen P, Carr BI, Knox JJ, Gill S, Qian J, et al. Linifanib phase II trial in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2010;28
104. Yau CC, Chen PJ, Curtis CM, Murphy PS, Suttle AB, Arumugham T, et al. A phase I study of pazopanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:3561

105. Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:2992–8
106. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*. 2006;5(16):1779–1787
107. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):834–846
108. Hsu C, Chen CN, Chen LT, Wu CY, Yang PM, Lai MY, Lee PH, Cheng AL. Low-dose thalidomide treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2003;65:242–249
109. Yau T, Chan P, Wong H, Ng KK, Chok SH, Cheung TT, Lam V, Epstein RJ, Fan ST, Poon RT. Efficacy and tolerability of low-dose thalidomide as first-line systemic treatment of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2007;72 Suppl 1:67–71
110. Chang JY, Ka WS, Chao TY, Liu TW, Chuang TR, Chen LT. Hepatocellular carcinoma with intra-atrial tumor thrombi. A report of three cases responsive to thalidomide treatment and literature review. *Oncology*. 2004;67(3-4):320-6
111. Yau T, Chan P, Wong H, Ng KK, Chok SH, Cheung TT, Lam V, Epstein RJ, Fan ST, Poon RT. Efficacy and tolerability of low-dose thalidomide as first-line systemic treatment of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2007;72 Suppl 1:67-71. *Epub 2007 Dec 13*
112. Lai CL, Lau JY, Wu PC, Ngan H, Chung HT, Mitchell SJ, Corbett TJ, Chow AW, Lin HJ. Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology*. 1993;17:389–394
113. Lai CL, Wu PC, Lok AS, Lin HJ, Ngan H, Lau JY, Chung HT, Ng MM, Yeoh EK, Arnold M. Recombinant alpha 2 interferon is superior to doxorubicin for inoperable hepatocellular carcinoma: a prospective randomised trial. *Br J Cancer*. 1989;60:928–933
114. Llovet JM, Sala M, Castells L, Suarez Y, Vilana R, Bianchi L, Ayuso C, Vargas V, Rodes J, Bruix J. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2000;31:54–58
115. Camma C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol* 2001; 34: 593–602
116. Guo R, Huang Z, Shu Y, Jin S, Ge H. Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of survivin expression. *Biomed Pharmacother*. 2009 Jun;63(5):375-9. *Epub 2008 Oct 23*

117. Guo R, Wang T, Shen H, Ge HM, Sun J, Huang ZH, Shu YQ. Involvement of mTOR and survivin inhibition in tamoxifen-induced apoptosis in human hepatoblastoma cell line HepG2. *Biomed Pharmacother.* 2010 Apr;64(4):249-53
118. Di Bisceglie AM, Osmack P, Brunt EM. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma: use of tamoxifen in an animal model of hepatocarcinogenesis. *J Lab Clin Med.* 2005 Mar;145(3):134-8
119. Shin JW, Chung YH, Park MI, Kim JA, Choi MH, Lee YJ, Ryu SH, Park NH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ, Yu ES. The effects of tamoxifen on human hepatocellular carcinoma cell proliferation and transforming growth factor-beta1 expression. *Taehan Kan Hakhoe Chi.* 2003 Mar;9(1):10-6
120. Liu CL, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Poon RT, Wong J. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with tamoxifen and the correlation with expression of hormone receptors: a prospective randomized study. *Am J Gastroenterol.* 2000 Jan;95(1):218-22
121. Castells A, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Roca M, Boix L, Vilana R, Rodes J. Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo-controlled trial in 120 patients. *Gastroenterology.* 1995;109:917-922
122. Tamoxifen in treatment of hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. CLIP Group (Cancer of the Liver Italian Programme) *Lancet.* 1998;352:17-20
123. Chow PK, Tai BC, Tan CK, Machin D, Win KM, Johnson PJ, Soo KC. High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: A multicenter randomized controlled trial. *Hepatology.* 2002;36:1221-1226
124. Llovet, J.M. and J. Bruix. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology,* 2003. 37(2): 429-42
125. Barbare JC, Bouché O, Bonnetain F, Raoul JL, Rougier P, Abergel A, Boige V, Denis B, Blanchi A, Pariente A, Milan C, Bedenne L. Randomized controlled trial of tamoxifen in advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005 Jul 1;23(19):4338-46
126. Nowak AK, Stockler MR, Chow PK, Findlay M. Use of tamoxifen in advanced-stage hepatocellular carcinoma. A systematic review. *Cancer.* 2005 Apr 1;103(7):1408-14
127. Chow PK, Tai BC, Tan CK, Machin D, Win KM, Johnson PJ, Soo KC; Asian-Pacific Hepatocellular Carcinoma Trials Group. High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: A multicenter randomized controlled trial. *Hepatology.* 2002 Nov;36(5):1221-6
128. Perrone F, Gallo C, Daniele B, Gaeta GB, Izzo F, Capuano G, Adinolfi LE, Mazzanti R, Farinati F, Elba S, Piai G, Calandra M, Stanzione M, Mattera D, Aiello A, De Sio I, Castiglione F, Russo M, Persico M, Felder M, Manghisi OG, De Maio E, Di Maio M, Pignata S; Cancer of Liver Italian Program (CLIP) Investigators. Tamoxifen in the treatment of

hepatocellular carcinoma: 5-year results of the CLIP-1 multicentre randomised controlled trial. *Curr Pharm Des.* 2002;8(11):1013-9

129. Raderer, M., M. Hejna, et al. (2000). "Treatment of hepatocellular cancer with the long acting somatostatin analog lanreotide in vitro and vivo." *Int J Oncol* 16(6): 1197- 201

130. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973): Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179, S.77-79

131. Kruhlich L, Dhariwal APS, McCann SM (1968): Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, 83, S.783-790

132. Patel YC (1999): Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20, S.157-198

133. Fehmann, H. C. and R. Arnold (1996). Molecular biology, pharmacology and signal transduction of 5 cloned human somatostatin receptors. *Z Gastroenterol* 34(11): 767-74

134. Fehmann HC, R. Arnold. Somatostatin receptors: a new pathway into the tumor? *Z Gastroenterol.* 1996;34(5):298-9

135. Reichlin S (1983): Somatostatin. *New England Journal of Medicine*, 309, S.1556-1563

136. Lehy, T., M. Dubrasquet, et al. (1979). Effect of somatostatin on normal and gastric-stimulated cell proliferation in the gastric and intestinal mucosae of the rat. *Digestion* 19(2): 99-109

137. Serri O, Brazeau P, Kachra Z, Posner B (1992): Octreotide inhibits Insulin- like Growth Factor-I hepatic gene expression in the hypophysectomized rat; evidence for a direct and indirect mechanism of action. *Endocrinology*, 130, S.1816-1821

138. Bousquet C, Puente E, et al.: Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy.* 2001; 47: 30- 39

139. Cascino S, Catalano V, et al.: Gastrointestinal cancer refractory to chemotherapy: A role for octreotide? *Chemotherapy.* 2001, 47: 127- 133

140. Rosenberg L. Pancreatic cancer: Does octreotide offer any promise? *Chemotherapy.* 2001; 47: 134-149

141. Scarpignato C, Pelosini I. Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis. *Chemotherapy.* 2001; 47: 1-29

142. Ferjoux, G., C. Bousquet, et al. (2000). Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 94(3-4): 205-10

143. Dasgupta P. Somatostatin Analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol. Ther.*, 102,61-85

144. Jia, W.D., Xu G.L. Xu RN et al. Oktreotid acts as an antitumor angiogenesis compound and supresses tumor growth in nude mice bearing human hepatocellular carcinomaxenografts. *J.Cancer Res. Clin.Oncol.* 129.327-334
145. Lamberts, S.W., A.J. van der Lely, et al. "Octreotide." *N Engl J Med* 334(4): 246-54(1996)
146. Pasquali D, Rossi V, Conzo G, Pannone G, Bufo P, De Bellis A,Renzullo A et all. Effects of somatostatin analog SOM230 on cell proliferation, apoptosis, and catecholamine levels in cultured pheochromocytoma cells. *J Mol Endocrinol.* 2008;40:263-71
147. Mariniello B, Finco I, Sartorato P, Patalano A, Iacobone M, Guzzardo V, Fassina A, Mantero F. Somatostatin receptor expression in adrenocortical tumors and effect of a new somatostatin analog SOM230 on hormone secretion in vitro and in ex vivo adrenal cells. *J Endocrinol Invest.* 2010 Oct 27.
148. Casnici C, Lattuada D, Perego C, Franco P, Marelli O. Inhibitory effect of somatostatin on human T lymphocytes proliferation. *Int J Immunopharmacol.* 1997 Nov-Dec;19(11-12):721-7
149. Ferone D, van Hagen MP, Kwekkeboom DJ, van Koetsveld PM, Mooy DM, Lichtenauer-Kaligis E, Schönbrunn A, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Somatostatin receptor subtypes in human thymoma and inhibition of cell proliferation by octreotide in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Apr;85(4):1719-26
150. Pagliacci MC, Tognellini R, Grignani F, Nicoletti I. Inhibition of human breast cancer cell (MCF-7) growth in vitro by the somatostatin analog SMS 201-995: effects on cell cycle parameters and apoptotic cell death. *Endocrinolog.* 1991,November;129(5):2555-62
151. Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, Kampa M, Vasilaki A, Xidakis C, Cas- tanas E, Thermos K et all. Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors. *Journal of Hepatology,* 40(5), S.792-798.
152. Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris.* 2000;94(3-4):205-10
153. Candi E, Melino G, De Laurenzi V, Piacentini M, Guerrieri P, Spinedi A, Knight RA. Tamoxifen and somatostatin affect tumours by inducing apoptosis. *Cancer Lett.* 1995 Sep 4;96(1):141-5
154. Patel YC, Greenwood M, Panetta R, Hukovic N, Grigorakis S et all. Molecular biology of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism.* 1996 Aug;45(8 Suppl 1):31-8
155. Srikant CB. Human somatostatin receptor mediated antiproliferative action evokes subtype selective cytotoxic and cytostatic signaling. *1997 Sep-Dec;70(5-6):541-8*
156. Tjomsland V, El-Salhy M. Effects of single, double or triple combinations of octreotide, galanin and serotonin on a human pancreatic cancer cell line. *Histol Histopathol.* 2005 Apr;20(2):537-41

157. Zalutnai A, Bocsi J. Short-term octreotide treatment induces apoptosis in human pancreatic cancer xenografts. *In Vivo*. 2006 Jul-Aug;20(4):549-52
158. Weckbecker G, Raulf F, Bodmer D, Bruns C. Indirect antiproliferative effect of the somatostatin analog octreotide on MIA PaCa-2 human pancreatic carcinoma in nude mice. *Yale J Biol Med*. 1997;70:549-54
159. Yun-Peng Hua, Xiao-Yu Yin, Bao-Gang Peng et al. Mechanisms and Influence of Octreotide-Induced Regulation of Somatostatin Receptor 2 on Hepatocellular Carcinome. *Chemotherapy* 2009;55:312-320
160. Rahmi G, Malka D, Tomasic G, Dromain C, Ducreux M, Boige V. Complete, long-standing regression of hepatocellular carcinoma after somatostatin analogue treatment. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 1;25(16):e15-6. No abstract available.
161. Samonakis DN, Moschandreas J, Arnaoutis T, Skordilis P, Leontidis C, Vafiades I, Kouroumalis E. Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues. *Oncol Rep*. 2002 Jul-Aug;9(4):903-7.
162. Siveke JT, Herberhold C, Folwaczny C. Complete regression of advanced HCC with long acting octreotide. *Gut*. 2003 Oct;52(10):1531
163. Samonakis DN, Moschandreas J, Arnaoutis T, Skordilis P, Leontidis C, Vafiades I, Kouroumalis E. Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues. *Oncol Rep*. 2002 Jul-Aug;9(4):903-7
164. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut*. 1998 Mar;42(3):442-7
165. Kouroumalis E, Samonakis D, Skordilis P. Octreotide treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003 Feb;37(2):477
166. JT Siveke, C Folwaczny and C Herberhold. *Gut* 2003;52;1531-
doi:10.1136/gut.52.10.1531-a
167. G Rahmi, D Malka, G Tomasic, C Dromain, M Ducreux, and V Boige. Complete, long-standing regression of hepatocellular carcinoma after somatostatin analogue treatment. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 1;25(16):e15-6
168. Becker G, Allgaier HP, Olschewski M, Zähringer A, Blum HE; HECTOR Study Group. Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study. *Hepatology*. 2007; 45: 9-15.
169. Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, Zisimopoulos A, Andriotis E, Panagiotakos D, Fotopoulou A, Chrysohoou C, Bazinis A. Long acting octreotide in the treatment of advanced hepatocellular cancer and overexpression of somatostatin receptors: randomized placebo-controlled trial. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 3164-70.

170. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (1992). Vol. 89, S.251-255
171. Hoyer D, Luebbert H, Bruns C. Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1994, 350, S.441-453
172. Kimura N, Pilichowska M, Date F, Kimura I, Schindler M. Immunohistochemical expression of somatostatin type 2A receptor in neuroendocrine tumors. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5, S.3483-3487
173. Hofland LJ, Liu Q, van Koetsveld PM, Zuijderwijk J, van der Ham F, de Krijger RR, Schonbrunn A, Lamberts SW. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2A in human somatostatin receptor positive tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999, 84, S.775-780
174. Notas G, Kolios G, et al. Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors. *J Hepatol*, 2004, 40(5): 792-8
175. I Neumann, S. Mirzaei, R. Birck, K. Osinger, R. Waldherr, H.D. Köhn and F.T. Meisl. *Rheumatology* 2004;43:195-201
176. Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW. Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 43, S.27-35
177. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *European Journal of Nuclear Medicine*, 2001, 28, S.836-846
178. Vikić-Topić S, Raisch KP, Kvols LK, Vuk-Pavlović S. Expression of somatostatin receptor subtypes in breast carcinoma, carcinoid tumor and renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995, 80, S.2974-2979
179. Reubi JC, Waser B. Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2003, 30, S.781-793
180. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *European Journal of Nuclear Medicine*, 2001, 28, S.836-846
181. Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S, Helboe L, Schindler M, Cole SL. Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Archiv*, 2002, 440, S.461-475

182. De Herder WW, Hofland LJ, van der Lely AJ, Lamberts SWJ. Somatostatin receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer*, 2003, 10, S.451-458
183. Anne Dutour, Ujendra Kumar, Rosemarie Panetta, L'Hovicine Ouafik, Federic Fina, Ramakrishna Sasi, and Yogesh C. Patel. Expression of somatostatin receptor subtypes in human brain tumors. *Int. J. Cancer*. 1998 May 29;76(5):620-7
184. Kumar U, Grigorakis SI, Watt HL, Sasi R, Snell L, Watson P, Chaudhari S. Somatostatin receptors in primary human breast cancer: quantitative analysis of mRNA for subtypes 1--5 and correlation with receptor protein expression and tumor pathology. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Jul;92(2):175-86.
185. Lamberts SWJ, van der Lely AJ, Hofland LJ. New somatostatin analogs: will they fulfil old promises? *European Journal of Endocrinology*, 2002, 146. 701-705
186. Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *Journal of Endocrinological Investigation*, 1997, 20, S.348-367
187. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON: Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut* 1998; 42: 442-447
188. Reubi JC, Zimmermann A, Jonas S, et al. Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut* 1999;45:766-74
189. Reynaert H. *et al.* Expression of somatostatin receptors in normal an corrhotic human liver and hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53:1180-1189
190. Bläker M, Schmitz M, Gocht A et al.: Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas. *J. Hepatology* 2004; 41: 112-118
191. M. Filopanti, C. Ronchi, E. Ballarè, S. Bondioni, A. G. Lania, M. Losa, S. Gelmini. Analysis of somatostatin receptor 2 and 5 polymorphisms in patients with acromegaly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* published online May 24, 2005; , doi: 10.1210/jc.2005-0132
192. Mercedes Sotos-Prieto, Marisa Guillén, Patricia Guillem-Sáiz, Olga Portolés, Dolores Corella. *Ann Nutr Metab* 2010;57:124-131
193. Li D, Tanaka M, Brunicardi FC et al., Association between somatostatin receptor 5 gene polymorphisms and pancreatic cancer risk und survival. *Cancer*. 2011 Jul 1; 117(13): 2863-72. Doi: 10.1002/cncr.25858. Epub 2011 Jan 10.
194. E. Buddecke. *Molekulare Medizin, eine systematische Einführung. Buch*, 2002.
195. Hennig. *Genetik*, 3. Auflage
196. Yamada Y, Stoffel M, Espinosa R 3rd, Xiang KS, Seino M, Seino S. Human somatostatin receptor genes: localization to human chromosomes 14, 17, and 22 and identification of simple tandem repeat polymorphisms. *Genomics*. 1993 Feb;15(2):449-52

197. Wagner K, Hemminki K et al., Polymorphismus in genes involved in GH 1 release and their association with breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2006 Sep;27(9):1867-75. Epub 2006 Apr 10.
198. Carless MA, Curran JE et al., Association analysis of somatostatin receptor (SSTR1 und SSTR2) polymorphisms in breast cancer and solar keratosis. *Cancer Lett*. 2001 May 26; 166(2): 193-7
199. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res*. 1998; 16:1215.
200. Alberts et al. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiology*, 2005
201. Seyffert. *Lehrbuch der Genetik*, 2. Auflage
202. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1995 Jan;9(1):48-55
203. Dela Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3380-7
204. Karachristos A, Liloglou T, Field JK, Deligiorgi E, Kouskouni E, Spandidos DA. Microsatellite instability and p53 mutations in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999 Sep-Dec;2(3):155-61
205. Xu Y, Berelowitz M und Bruno JF. Characterisation oft he Promoter region of thge humen somatostatin receptor subtype 2 gene and localisation of sequences required for estrogen-responsiveness. *Moll. Cell. Endocrinol*. 1998; 139: 71-77.
206. A. Kubota, Y. Yamada, S. Kagimoto, A. Shimatsu, M. Imamura, K. Tsuda, H. Imura. Identification of somatostatin receptor subtypes and an implication for the efficacy of somatostatin analogue SMS 201-995 in treatment of human endocrine tumors. *J.Clin. Invest*. 93 (1994) 1321-1325.
207. Y. Yamada, M. Stoffel, R. Espinosa, K. Xiang, M. Seino, S. Seino, M. LeBeau, G. Bell. Human somatostatin receptor genes: localization to human chromosomes 14, 17, 22 and identification of simple tandem repeat polymorphisms. *Genomics* 15 (1992) 449-452.
208. J.F.Bruno, Y.Xu, J.Song, M.Berelovitz. Molecular cloning and functional expression of a brain specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 89 (1992) 11151-11155.
209. Bruns C1, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol*. 2002 May;146(5):707-16.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Siebeck, Oberarzt der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Universität München, herzlich bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Herr Prof. Siebeck hat mir seine Betreuung zugesagt, als ich mich noch in Aserbaidshan befand und mich beim DAAD um ein Forschungsstipendium in Deutschland bewerben wollte. Besonders dankbar bin ich ihm auch für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und für viele anregende Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Herr Prof. Siebeck hat nicht nur in fachspezifischen, sondern auch in privaten Gesprächen immer dafür gesorgt, dass ich meinen Geist anstrenge. Er hat mir in schwierigen Situationen ein Stück von seiner Lebenserfahrung mit auf den Weg gegeben und war nicht nur ein großartiger wissenschaftlicher Betreuer, sondern auch ein wunderbarer hilfsbereiter Unterstützer bei allen möglichen Fragen, den jeder Gastwissenschaftler und ausländischer Promotionsstudent, der Heimweh hat und 5000 km weit weg von seiner Heimat lebt, braucht.

Frau PD Dr. med. Helga-Paula Török danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Mitbetreuung und ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen. Dankbar anerkennen will ich auch ihre immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft, mir ihr großes molekular-biologisches Wissen und ihre praktische Erfahrung bei genetischer Forschung weiterzugeben. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich bei ihr herzlich bedanken.

Herrn Dr. Laurian Tonenchi sei herzlich gedankt für seine hilfreichen Tipps, Diskussionsbeiträge und Mithilfe bei der Einführung in die experimentell-genetischen und molekular-biologischen Untersuchungsverfahren, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderen Dank schulde ich auch den vielen Mitarbeitern des Labors des LMU-Klinikums München für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft.

Sowohl bei dem DAAD, als auch dem Bildungsministerium des Republik Aserbaidshan und deren hilfsbereiten Mitarbeitern, meinen freundlichen und geduldigen Ansprechpartnern bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung meines Studiums und dieser Arbeit.

Ich bedanke mich auch bei allen deutschen und ausländischen Kollegen und Freunden, die mir hier in München ein Heimgefühl verschafft haben, was für mich psychologisch sehr unterstützend war.

Bei meinen Eltern und Geschwistern, die mir auch das Studium der Humanmedizin in Aserbaidshan ermöglichten und mich meinen Weg haben gehen lassen und mich stets darin unterstützt haben meine Ziele zu erreichen, möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums in Deutschland, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Versicherung

Abdullayev, Fariz

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Polymorphismen in den Somatostatinrezeptoren SSTR₁ und SSTR₂ bei hepatozellulären Karzinomen“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 19.08.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand